

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

ESTUDO DA EFICÁCIA E DOS MECANISMOS CELULARES DE ESQUEMAS  
TERAPÊUTICOS CONTENDO METFORMINA CONTRA O CÂNCER DE  
MAMA TRIPLO-NEGATIVO

Isabella dos Santos Guimarães

VITÓRIA  
JANEIRO, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

ESTUDO DA EFICÁCIA E DOS MECANISMOS CELULARES DE ESQUEMAS  
TERAPÊUTICOS CONTENDO METFORMINA CONTRA O CÂNCER DE  
MAMA TRIPLO-NEGATIVO

Isabella dos Santos Guimarães

Defesa de Tese ao atendimento das  
normas exigidas do programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia.

Orientação: Professor (a) Dr(a). Leticia  
Batista Azevedo Rangel

VITÓRIA

JANEIRO, 2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)  
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

---

Guimarães, Isabella dos Santos, 1987 -  
G963e Estudo da eficácia e dos mecanismos celulares de esquemas terapêuticos  
contendo metformina contra o câncer de mama triplo-negativo / Isabella dos  
Santos Guimarães - 2018.  
146 f. : il.

Orientador: Leticia Batista Azevedo Rangel.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito  
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neoplasias da Mama. 2. Metformina. 3. Envelhecimento. I. Rangel,  
Leticia Batista Azevedo. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro  
de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

## DEFESA DE TESE

ISABELLA DOS SANTOS GUIMARÃES

### ESTUDO DA EFICÁCIA E DOS MECANISMOS CELULARES DE ESQUEMAS TERAPÊUTICOS CONTENDO METFORMINA CONTRA O CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

Banca Examinadora:

---

Dr.<sup>a</sup> Leticia Batista Azevedo Rangel  
UFES-RENORBIO (Orientadora)

---

Dr.<sup>a</sup> Adriana Madeira Alvares da Silva  
UFES-RENORBIO (Titular)

---

Dr.<sup>a</sup> Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves  
UFES (Titular)

---

Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende  
UFES-RENORBIO (Titular)

---

Dr. Jones Bernardes Graceli  
UFES-RENORBIO (Titular)

TIPO DE SESSÃO: Aberta

DIA: 26 de Janeiro de 2018

HORÁRIO: 08:00

LOCAL: Universidade Federal do Espírito Santo – Auditório do Núcleo de  
Biotecnologia

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente aos meus pais pelo apoio incondicional, ensinamentos e amor.

Ao Tullio por me acompanhar nessa jornada. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros, ele esteve do meu lado sempre me fazendo acreditar que tudo daria certo.

Aos meus familiares e amigos extra-lab pelo carinho e apoio, mesmo sem entender o que de fato estou fazendo. Especialmente na reta final: vocês foram fundamentais!

Agradeço a UFES e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO).

Fazer pesquisa não é simples. No Brasil é ainda mais complexo. E nada disso seria possível sem a ajuda de várias pessoas. Agradeço a todos pelo suporte científico, psicológico, auxílio direto ou indireto fundamentais para a realização desse trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leticia Batista Azevedo Rangel, pela confiança, orientação e grande contribuição para minha formação profissional.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano (LBCMCH) pelo carinho e companheirismo, mesmo de longe me ajudaram em todos os momentos (Nay, Di, Paulo, Taci e companhia)

Ao laboratório de Pesquisa Clínica (SPC) do INCa: À Dr<sup>a</sup> Cinthya Sternberg, pela oportunidade. Aos amigos que passaram por lá e me receberam com um enorme carinho e que me ajudaram e muito na minha adaptação (Joyce, Vivi, Haynna, Amanda, Vitor). Aos amigos que permanecem pelo companheirismo e incalculáveis “quebras de galho” (Eli, Débora, Leandro e Renan). À Dr<sup>a</sup> Andréia Melo pela oportunidade de continuar os experimentos no laboratório. Aos amigos-vizinhos da Farmacologia e alunas do Grupo Etel pela pronta ajuda sempre que precisei.

À Drª Etel Gimba pela parceria e por me salvar inúmeras vezes com reagentes, equipamentos, conversas científicas, etc.

À Drª Morgana Castelo-Branco pela ajuda nos experimentos de dosagem de citocinas.

Às Agências de Fomento: CAPES, FAPES e CNPq.

“A ciência nos traz conhecimento; a vida, sabedoria.”

Will Durant

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	14
RESUMO .....	16
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	6
1.1. CÂNCER DE MAMA .....	6
1.2. CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO .....	10
1.3. QUIMIORRESISTÊNCIA .....	13
1.4 SENESCÊNCIA.....	14
1.5. METFORMINA .....	18
3. OBJETIVO GERAL.....	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1 Linhagens celulares, condições de cultivo e análise da morfologia celular.....	25
4.2 Ensaio de viabilidade metabólica celular e cálculo de IC <sub>50</sub> .....	25
4.3 Ensaio de formação de colônias .....	26
4.4 Avaliação da morte celular: marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (PI) .....	26
4.5 Indução de resistência nas linhagens de CAM .....	27
4.6 Análise da senescência celular: teste de coloração SA-β-GAL .....	27
4.7 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) .....	28
4.8 Estudo da secreção de citocinas pró-inflamatórias através de ELISA .....	30



4.9 Imunoblotting .....	30
4.8 Análise estatística .....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Efeito da metformina em monoterapia na proliferação celular e formação de colônias em linhagens de TNBC e Luminal. ....	34
5.2 Efeito da metformina em combinação com quimioterápicos na proliferação celular de linhagens TNBC e Luminal. ....	36
5.3 Estabelecimento de linhagens de CAM resistentes ao paclitaxel .....	42
5.4 Caracterização das linhagens de CAM resistentes ao paclitaxel .....	46
5.3 Avaliação da metformina no regime terapêutico do TNBC resistente ao paclitaxel .....	67
6. CONCLUSÃO .....	77
7. PERSPECTIVAS .....	80
8. REFERÊNCIAS .....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativas de câncer para o biênio 2016-2017, exceto para câncer de pele não melanoma, na população brasileira, de acordo com o sexo. Fonte: INCA, 2015.....	6
Figura 2 - Classificação molecular do TNBC (PRAT et al., 2010). ....	11
Figura 3 - Modelo esquemático da senescência celular e suas funções biológicas. ....	16
Figura 4 - Estrutura molecular da metformina.....	19
Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos de ação da metformina no câncer.....	22
Figura 6 – Avaliação da inibição da proliferação celular da Metformina em linhagens de CAM. Análise da inibição da proliferação celular e formação de colônias de tratamento com metformina nas linhagens de câncer de mama ...	35
Figura 7 - Efeitos do paclitaxel, doxorrubicina e cisplatina em monoterapia e combinados com 10 $\mu$ M de metformina por 48h na proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 avaliado pelo método de MTT.....	38
Figura 8 - Efeitos do paclitaxel, doxorrubicina e cisplatina em monoterapia e combinados com 10 $\mu$ M de metformina por 48h na proliferação celular da linhagem HCC70 avaliado pelo método de MTT.....	39
Figura 9 - Efeitos do paclitaxel, doxorrubicina e cisplatina em monoterapia e combinados com 10 $\mu$ M de metformina por 48h na proliferação celular da linhagem MCF-7 avaliado pelo método de MTT.....	40
Figura 10 - Estabelecimento da linhagem resistente ao paclitaxel. (A) Análise da inibição da proliferação celular do PTX na linhagem de CAM MDA-MB-231 e a variante gerada após exposição com PTX (MDA231-PR). ....	44
Figura 11 - Estabelecimento da linhagem resistente ao paclitaxel. (A) Análise da inibição da proliferação celular do PTX na linhagem de CAM luminal A MCF-7 e a variante gerada após exposição com PTX (MCF7-PR). ....	45

Figura 12 - Avaliação da resistência cruzada aos quimioterápicos 5-fluoroacil, doxorrubicina e cisplatina na linhagem triplo-negativa resistente ao paclitaxel MDA231-PR.....	47
Figura 13 - Avaliação da resistência cruzada aos quimioterápicos 5-fluoroacil, doxorrubicina e cisplatina na linhagem triplo-negativa resistente ao paclitaxel MDA231-PR.....	47
Figura 14 - As variantes resistentes ao paclitaxel (MDA231-PR e MCF7-PR) apresentaram marcação de SA- $\beta$ -GAL.....	50
Figura 15 - As variantes resistentes à doxorrubicina (MDA231-DR e MCF7-DR) apresentaram marcação de SA- $\beta$ -GAL.....	51
Figura 16 - Aumento de expressão dos inibidores de CDKs, CDKN2A (p16 <sup>INK4a</sup> ), CDKN1A (p21 <sup>WAF1</sup> ) e CDKN1B (p27 <sup>kip1</sup> ) nas linhagens resistente ao PTX (MDA231-PR e MC7-PR).....	53
Figura 17 - Resistência ao PTX na linhagem triplo negativa MDA231-PR resulta em aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas com SASP.....	55
Figura 18 - Resistência ao PTX na linhagem triplo negativa MDA231-PR resulta em aumento dos marcadores de CSC.....	59
Figura 19 - Resistência ao PTX na linhagem triplo negativa MDA231-PR resulta em aumento da expressão de p70S6K.....	61
Figura 20 - Análise da expressão de ERK, GSK-3 $\beta$ e p70S6K <sup>T421/S424</sup> nas linhagens MDA-MB231 e MDA231-PR.....	63
Figura 21 - Análise da expressão de Beclina-1, LC3B e Bax nas linhagens MDA-MB231 e MDA231-PR.....	65
Figura 22 – Tratamento com MET não impediu o aparecimento do fenótipo senescente na linhagem de CAM resistente ao PTX (MDA231-PR).....	69

Figura 23 - Efeito do meio condicionado da linhagem MDA231-PR na indução de apoptose frente ao tratamento com paclitaxel e a re-sensibilização após cotratamento com metformina na linhagem parental MDA-MB-231. ....	71
Figura 24 - Adição de MET ao tratamento com PTX modula a expressão das citocinas pró-inflamatórias envolvidas com SASP.. ....	74
Figura 25 - Adição de MET ao tratamento com PTX modula a expressão das citocinas pró-inflamatórias envolvidas com SASP. ....	75
Figura 26 - Adição de MET ao tratamento com PTX modula a expressão de P70S6K.....	76
Figura 27 - Modelo dos mecanismos celulares possivelmente modulados pelos tratamentos intermitentes com paclitaxel na variante gerada MDA231-PR.. ....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação imuno-histoquímica dos tumores de mama. ....	8
Tabela 2 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados no qPCR. ....	29
Tabela 3: Descrição dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de análise da expressão proteica. ....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AKT - Proteína quinase B

AMPK - Proteína Cinase Ativada por Monofosfato de Adenosina

ATG - Genes relacionados com a autofagia

BAX: Bcl-2 “associated protein” X

BCL-2: B-cell lymphoma protein 2

BCSC - Breast Cancer Stem Cells

BRCA1/2 - Oncogene do Câncer de Mama ½

CAM - Câncer de mama

CDIS - Carcinoma ductal *in situ*

CDIS-SOE - Carcinoma invasivo sem outras especificações

CDDP - Cisplatina (cis-diaminodicloroplatina (II))

C/EBP $\beta$  - proteína ligante do potencializador CCAAT gamma

DEPC - Pirocarbonato de dietila

DDIS - Senescência induzida por dano ao DNA

DOX - Doxorrubicina

DMSO - Dimetilsulfóxido

EGFR - Receptor de fator de crescimento epidérmico

ERK1/ERK2 - quinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

ESA – Antígeno de superfície epitelial

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GSK-3 $\beta$  - Glicogênio sintase 3 cinase  $\beta$

HER2 - Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

IGF-1- Receptor do fator de crescimento semelhante ao de insulina-1

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

KRAS - Oncogene homólogo ao oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten

LKB1 - Supressor Tumoral Serina/Treonina Cinase 11

MAPK - Proteína quinase ativada por agentes mitogênicos

mRNA - RNA mensageiro

MET - Metformina

MMP3 - metaloproteases 3

mTOR - Proteína alvo de rapamicina em mamífero

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NFκB - Fator nuclear kappa B

OIS – Senescência induzida por oncogene

PBS - Tampão salino- fosfato

pH - Potencial hidrogeniônico

PI3K- Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase

PTX - Paclitaxel

p38 – Proteína cinase ativada por mitógenos p38

p53 - Oncogene 53

pCR - Resposta patológica completa

pRB - Proteína Retinoblastoma

qPCR - PCR em tempo real

SEN-REP - Senescência replicativa

S6K-1 - Fator de regulação traducional da proteína ribossomal S6 quinase-1

SASP – Fenótipo Secretório Associado à Senescência

RA – Receptor de androgênios

RE – Receptor de estrogênio

RP – Receptor de progesterona

EMT- Transição Epitélio-Mesênquima

TIS - Senescência induzida por terapia

TNBC – Câncer de mama triplo-negativo

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

X-GAL - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopiranosídeo

## RESUMO

O câncer de mama (CAM) é uma doença complexa e heterogênea composta por múltiplos subgrupos associados às características biológicas e morfológicas distintas, com diferentes manifestações clínicas e padrões de resposta às terapias vigentes. Dentre os subtipos de CAM, o câncer de mama triplo negativo (TNBC) congrega tumores majoritariamente agressivos e invasivos, associados à doença de prognóstico ruim, bem como pela quimiorresistência das células tumorais aos quimioterápicos disponíveis (paclitaxel e doxorrubicina). Tratamentos com quimioterápicos podem promover senescência celular, principalmente senescência associada ao fenótipo secretor (SASP) com funções tanto antitumorais quanto protumorigênicas. A metformina tradicionalmente empregada no tratamento do diabetes, despontou, nos últimos anos, como uma opção terapêutica contra o CAM, inclusive o TNBC. Investigamos o efeito da metformina em monoterapia e em combinação com quimioterápicos utilizando o método de MTT e formação de colônias; A expressão gênica e proteica, bem como a secreção de proteínas no meio extracelular foi realizada por real-time PCR, western-blot e ELISA. Realizamos ainda, ensaios de apoptose por citometria de fluxo e marcação de SA- $\beta$ -Gal para determinar senescência celular. Nossos resultados mostraram os efeitos antiproliferativos da metformina nas linhagens TNBC. Adicionalmente, a combinação de metformina, em doses clinicamente relevantes, com paclitaxel e doxorrubicina, mas não cisplatina, aumentou a inibição da proliferação celular quando comparado ao quimioterápico em monoterapia. Estabelecemos linhagem TNBC resistente ao paclitaxel (MDA231-PR) e caracterizamos o SASP como um dos mecanismos efetores da quimiorresistência ao taxano. A linhagem triplo-negativa resistente ao taxano apresentou resistência cruzada à doxorrubicina e 5-fluoroacil. Outras vias importantes relacionadas com a resistência adquirida também foram observadas (CSC, Apoptose, Autofagia, MAPK e GSK-3 $\beta$ ) na linhagem resistente ao taxano. Interessantemente, metformina modulou a expressão de citocinas inflamatórias relacionadas com SASP e reverteu a resistência ao paclitaxel na linhagem parental MDA-MB-231 estabelecida pelo meio condicionado da linhagem resistente. Assim, nossos achados fundamentam o potencial uso da metformina no TNBC, um dos grandes desafios da clínica oncológica, principalmente em tumores refratários ou resistentes às terapias baseadas em taxanos.

**Palavras-Chave:** Câncer de Mama, Metformina, Quimiorresistência, Senescência e SASP.



## **ABSTRACT**

Breast cancer is a heterogeneous disease that can be subdivided into distinct tumor types based upon expression of molecular markers predicting patient outcomes and response to therapy. Triple-negative breast cancer (TNBC) is known for its poor prognosis and high recurrence probability. There is no effective targeted treatment for TNBC, but only adjuvant chemotherapies (anthracycline/taxane therapy). Many chemotherapeutic drugs alter cellular states, including the induction of senescence, in cancer cells and the tumor microenvironment. Cellular senescence is an important tumor-suppressive mechanism. However, acquisition of a senescence-associated secretory phenotype (SASP) in senescent cells has deleterious effects on the tissue microenvironment and, paradoxically, promotes tumor progression. Epidemiological and laboratory studies have suggested that metformin has antineoplastic activity. The effects of metformin alone or in combination with conventional drugs on resistant breast cancer cell lines were investigated using the MTT assay for cell proliferation and clonogenic assays; Gene, protein expression and secreted proteins were determined in breast cancer cells by real time real-time PCR, western blotting and ELISA assay respectively. We also used Flow Cytometry analysis for apoptosis and SA- $\beta$ -Gal staining for senescence detection. We found that metformin exhibited antiproliferative effects in several TNBC cell lines. The combined therapy containing conventional drugs (paclitaxel and doxorubicin) and safe doses of metformin improved the effect of the treatment in cell proliferation rate. We characterize SASP in our model of paclitaxel resistant cell. Additionally several pathways related with chemoresistant are also altered in paclitaxel resistant cell line (CSC, Autophagy, MAPK and GSK-3 $\beta$ ). We also show that the antidiabetic drug metformin inhibits the expression of genes coding for multiple inflammatory cytokines seen during cellular senescence. Remarkably, metformin reverse the resistance of paclitaxel in parental tumor cells with the presence of conditioned medium from resistant cell. Our findings support that metformin is a potential agent in the treatment of TNBC, a major challenge of clinical oncology, especially in tumors refractory to taxanes.

**Keywords:** Breast Cancer, Metformin, Chemoresistance, Senescence and SASP.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CAM) é uma doença complexa composta por múltiplos subtipos associados às características morfológicas e biológicas distintas, com diferentes padrões de resposta às terapias vigentes (VIALE et al., 2012; PEROU et al., 2000). Dentre os subtipos de CAM, destaca-se o câncer de mama triplo-negativo (TNBC), representando cerca de 10 a 15% dos tumores mamários. O TNBC congrega tumores heterogêneos, majoritariamente agressivos e invasivos, e que estão associados à doença de prognóstico ruim (ROUZIER et al., 2005).

O subtipo triplo-negativo é definido pela ausência de expressão de receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) pelas células tumorais. Consequentemente, esses tumores não são elegíveis às terapias endócrinas e alvo-específicas eficazes. O tratamento citotóxico realizado nas pacientes com TNBC segue o preconizado para o CAM em geral, não apresentando regimes específicos às características desse subtipo extremamente heterogêneo, contribuindo assim para o fracasso terapêutico e a progressão da doença (GOLDHIRSCH et al., 2007). Assim, diante do exposto, a identificação e caracterização de estratégias terapêuticas eficazes de combate ao TNBC são imperativas.

Historicamente, o fator limitante no tratamento de pacientes com câncer é aquisição de resistência aos agentes quimioterápicos, especialmente quando a quimioterapia é a principal conduta terapêutica de escolha. A quimiorresistência pode se manifestar clinicamente logo nos estágios iniciais de tratamento ou ser induzida durante o processo do tratamento quimioterápico (BHOSLE e HALL, 2009). Recentemente a senescência celular tem despertado interesse no estudo dos tumores tanto por suas consequências antitumorais quanto no favorecimento da progressão tumoral, escape às terapias empregadas e metástase (revisado por PÉREZ-MANCERA; YOUNG; NARITA, 2014).

Dentre os diversos tipos de senescência já caracterizadas, destacamos a senescência associada ao fenótipo secretor (SASP). O SASP está relacionado à promoção da transição epitélio mesênquima (EMT), indução de células tronco

tumorais (CSC), vascularização tumoral, alterações em diversas vias fundamentais para progressão tumoral, quimiorresistência, invasão e metástases (modulados principalmente por fatores secretados no microambiente tumoral como citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e moduladores da matriz extracelular) (PARRINELLO et al., 2005; COPPÉ et al., 2006; COPPÉ et al., 2008; KUILMAN et al., 2008).


A metformina (1,1-dimeti-bis-guanidina), tradicionalmente empregada no tratamento do diabetes (BAILEY C. J.; TURNER, R. C., 1996), despontou, nos últimos anos, como uma opção terapêutica contra o câncer de mama, inclusive o TNBC. O interesse pela metformina surgiu a partir da observação de estudos epidemiológicos, nos quais pacientes diabéticas com câncer de mama em uso de metformina como medicamento euglicemiante obtiveram respostas clínicas maiores do que aquelas usuárias de outros medicamentos hipo/euglicemiante (BODMER M. et al., 2010; HE X. et al., 2012). Surgiu, portanto, o racional teórico para a avaliação clínica da metformina em oncologia. Cumpre destacar, ainda, que a metformina é droga de baixo custo, além de medicação oral bem tolerada pelos usuários por apresentar perfil tóxico bem definido e modesto (DEFRONZO R. A., GOODMAN, A. M., 1995). Ademais o processo de reposicionamento de fármacos representa uma alternativa pertinente no tratamento oncológico ao utilizar fármacos já comercializados para o tratamento de outras doenças reduzindo custos e velocidade de desenvolvimento para a validação de um novo medicamento e/ou regime terapêutico (WÜRTH et al., 2016).

Dessa forma, buscamos avaliar a eficácia antineoplásica, bem como os mecanismos celulares modulados pela metformina em doses clinicamente seguras, em esquemas terapêuticos combinados com antraciclinas, taxanos e agentes alquilantes em um painel de linhagens TNBC. Adicionalmente, investigamos a resistência adquirida ao paclitaxel nos nossos modelos *in vitro* e a utilização da metformina na reversão desse fenômeno.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama (CAM) representa o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, com exceção dos tumores de pele não melanoma, sendo o que mais acomete as mulheres. Estimou-se que, em 2017, mais de 252.710 mil novos casos de CAM seriam diagnosticados nos Estados Unidos e aproximadamente 41.070 mil mulheres morreriam em decorrência da doença (ACS, 2017). No Brasil, especulou-se que para o biênio 2016-2017 ocorra o registro de mais de 57.960 mil novos casos da doença (INCA, 2015) (Figura 1). Além da grande taxa de incidência e mortalidade, o CAM é temido pelas mulheres pelos seus efeitos psicológicos, afetando a percepção da sexualidade e da autoimagem da paciente.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Óvário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

\* Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1 - Estimativas de câncer para o biênio 2016-2017, exceto para câncer de pele não melanoma, na população brasileira, de acordo com o sexo. Fonte: INCA, 2015.

O CAM é uma doença complexa e heterogênea, composta por múltiplos subgrupos associados às características biológicas e morfológicas distintas, com diferentes manifestações clínicas e padrões de resposta às terapias vigentes (revisado por VIALE, 2012; PEROU et al., 2000). Consequentemente, essa neoplasia não pode ser considerada uma entidade clinico-patológica única, sendo imprescindível a sua classificação em subgrupos que congregam características mais homogêneas. Atualmente, o CAM é classificado de acordo com suas características histológicas, imuno-histoquímicas e moleculares.

#### 1.1.1. Classificação do Câncer de Mama

##### 1.1.1.1. Classificação Histológica

A classificação histológica dos tumores mamários é baseada na diversidade das características morfológicas dos tumores e continua sendo o método de avaliação mais utilizado no CAM, devido ao seu baixo custo e importância prognóstica na graduação dos tumores (PAGE, 1997; RAKHA et al., 2007). É necessário ressaltar que a maioria dos especialistas sugere a complementação da classificação histológica tradicional com as informações de testes imuno-histoquímicos e moleculares.

Inicialmente, os tumores de mama são divididos em invasivos ou localizados (*in situ*). Os carcinomas *in situ* constituem uma neoplasia maligna mais precoce, cujo tratamento adequado resulta em excelente sobrevida global, sendo subclassificados em carcinoma lobular e ductal (TAVASSOLI & DEVILEE, 2003). O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) representa a maioria dos tumores localizados (Revisado por CONNOLLY, 2004). Os carcinomas invasivos são morfolologicamente subdivididos de acordo com os padrões de crescimento e grau de diferenciação (Revisado por RAKHA 2010). A maioria dos tumores de mama (60 a 70%) é classificada como carcinoma invasivo sem outras especificações (CDI-SOE), pois não exibem características suficientes, em mais de 50% da massa tumoral, para classificá-los nos subtipos histológicos (revisado por RAKHA 2010)

#### 1.1.1.2. Classificação Imuno-Histoquímica

Conforme previamente mencionado, a classificação histológica constitui uma ferramenta útil, mas limitada para o diagnóstico acurado do CAM. Nesse sentido, nas últimas décadas, esquemas de classificação baseados na caracterização imuno-histoquímica dos tumores mamários, associados aos fatores clinicopatológicos do CAM, promoveram melhoras no prognóstico da doença e servem de ferramenta auxiliar na decisão da estratégia terapêutica a ser empregada nos tumores (revisado por VIALE, 2012). Adicionalmente, a maioria dos subtipos moleculares, os quais serão discutidos adiante, pode ser retratado utilizando marcadores imuno-histoquímicos, reforçando a importância do procedimento no diagnóstico do CAM, o qual é técnica e economicamente mais viável que os procedimentos moleculares (YANG et al., 2007; RAKHA et al., 2007)

O perfil imuno-histoquímico dos tumores mamários é baseado na avaliação da expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), superexpressão do receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) pelas células tumorais, bem como pelo índice de proliferação celular por meio da investigação da expressão da proteína Ki67 pelas mesmas (expressa em todas fases do ciclo celular, exceto em G0) (revisado por DOWSETT et al., 2011). A análise do fenótipo obtido por meio da determinação do perfil imuno-histoquímico dos tumores permite classificá-los em CAM luminal A, luminal B, HER-2 “enriched” e triplo-negativos (TNBC) (Tabela 1) (revisado por WEIGELT & REIS-FILHO, 2010).

Tabela 1 - Classificação imuno-histoquímica dos tumores de mama.

<b>Subtipo Imuno-histoquímico</b>	<b>Padrão de imunomarcção</b>
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2*- e Ki-67 <14%**
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2*- e Ki-67 ≥14%**
	RE+ e/ou RP+, HER2*+
HER2	RE-, RP- e HER2*+
TNBC	RE-, RP-, HER2*-

\* São considerados casos positivos aqueles com score >3; Score iguais a 2 devem ser submetidos a análise por FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) ou CISH (Chromogenic In Situ Hybridization) para confirmação (Chuthapisith et al., 2012). \*\* De acordo com Cheang et al., 2009, a imunomarcção da proteína Ki67 ≥14% correlaciona-se com alta taxa de proliferação celular.

Classicamente, tumores CAM luminal expressam RE, (a síntese de RP é facultativa), entretanto, não expressam HER2. Por outro lado, estudos de análise molecular do CAM inseriram complexidade à classificação de tumores mamários luminais ao revelarem que os mesmos podem ser divididos de acordo com a taxa de proliferação celular e expressão de HER2 (CHEANG et al., 2009). Assim, CAMs luminal A são caracterizados pela ausência de expressão de HER2 e baixa taxa de proliferação celular, enquanto que os tumores luminal B podem apresentar os seguintes imunofenótipos: RE+, RP+/-,

HER2- e alto índice de proliferação ou RE+, RP+/-, HER2+. Vale ressaltar que a expressão dos receptores hormonais permite a esses subtipos o benefício da terapia endócrina com moduladores seletivos do RE ou inibidores da enzima aromatase, como o tamoxifeno e anastrozol, respectivamente.

A superexpressão do HER2 aliada à ausência de expressão dos receptores hormonais pelas células de CAM caracteriza o subtipo imuno-histoquímico HER2 “enriched”, compondo cerca de 20% das mulheres com CAM. Muito embora haja associação desse subtipo de CAM à doença de pior prognóstico (BULL et al, 2004; WOLFF et al., 2007), o emprego de terapias alvo-específicas com anticorpos monoclonais anti-HER2 tem contribuído significativamente com a melhora do desfecho clínico das pacientes portadoras da patologia (Revisado por AHMED; SAMI & XIANG, 2015).

Por fim, o TNBC é caracterizado pela ausência de expressão de RE, RP e HER2 pelas células tumorais, representando um grupo consistente e altamente heterogêneo na apresentação clínica, histológica e resposta à terapia. Por outro lado, são tumores majoritariamente agressivos e invasivos, associados a um pior prognóstico da doença (Revisado por MADEIRA et al., 2012), dentre outros aspectos, em função da inelegibilidade da paciente ao uso de terapias endócrina e alvo-específicas eficazes.

#### 1.1.1.3. Classificação Molecular

Durante os últimos 17 anos, os cinco subgrupos moleculares do CAM (luminal A, luminal B, basalóide, HER2 “enriched” e normal-símile) foram extensamente estudados e caracterizados. Em 2000, Perou e colaboradores demonstraram (2000) que o fenótipo diverso do CAM é acompanhado de uma heterogeneidade no padrão de expressão gênica (GEP) oriundos de estudos de microarranjo de cDNA. Esses pesquisadores, então, propuseram que o CAM pode ser classificado em subtipos distintos a partir das diferenças no GEP ou de suas assinaturas moleculares (PEROU et al., 2000).

## **1.2. CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO**

### **1.2.1. Aspectos Clínicos**

Epidemiologicamente, o TNBC acomete, com maior frequência, mulheres mais jovens (<50 anos), antes da menopausa e de ascendência africana (Revisado por BIANCHINI et al., 2016). Mutações em BRCA1/2 são incomuns nos CAM esporádicos, entretanto uma alta taxa, cerca de 20%, de mutações no gene BRCA1/2 tem sido reportado em pacientes com TNBC (GONZALEZ-ANGULO et al., 2011).

Como previamente mencionado, o comportamento clínico do TNBC é classicamente mais agressivo do que os demais tumores mamários; consequentemente, a sobrevida dessas pacientes é inferior comparada àquela de mulheres portadoras de outros subtipos imuno-histoquímicos de CAM (ROUZIER et al., 2005). A maioria dos tumores TNBC é classificado como CDI-SOE, mas outros tipos histológicos, mais raros, também estão associados (metaplásico, medular e tumores adenoides císticos) (revisado por CAREY et al., 2010). Além disso, os tumores triplo-negativos apresentam maior tropismo visceral, sendo a ocorrência de metástases cerebrais, muitas vezes, um problema secundário nesta doença (revisado por BIANCHINI et al., 2016).

### **1.2.2. Características moleculares do TNBC**

O TNBC é definido pela ausência de expressão do RE, RP e HER2, e, como mencionado anteriormente, destaca-se por apresentar alta heterogeneidade clínica, histológica e respostas distintas aos tratamentos. Essa diversidade também é retratada nos padrões de expressão gênica, que classificam a maioria dos tumores triplo-negativos em basalóides (39-54%), claudin-low (25-39%), seguidos do subtipo HER2 “enriched” (7-14%), luminal B (4-7%), luminal A (4-5%) e normal-símile (1%) (PRAT et al., 2010) (Figura 2).



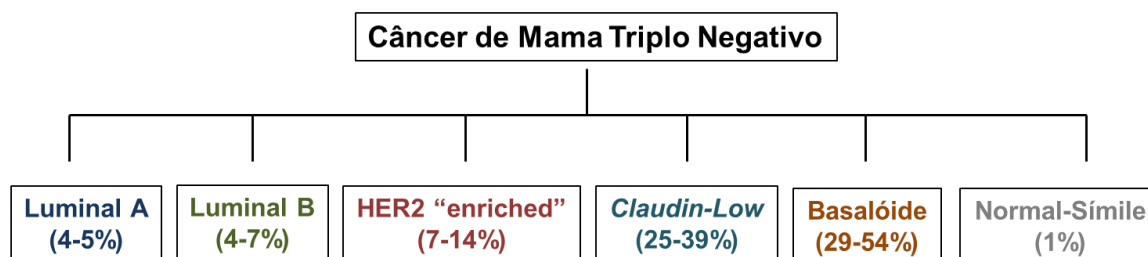


Figura 2 - Classificação molecular do TNBC (PRAT et al., 2010).

A complexidade do TNBC estimulou recentes estudos moleculares com intuito de compreender melhor a doença e identificar estratégias terapêuticas mais acuradas para seu controle clínico. Dois grupos independentes propuseram a classificação dos tumores triplo-negativos em quatro subtipos: *basal-like* (BL1 e BL2), mesenquimais (M) e receptor de androgênio luminal (LAR) baseados em análises de expressão gênica (PRAT et al., 2013; LEHMANN et al., 2016). Essa estratificação é corroborada por estudos *in vitro* que analisaram um extenso painel de linhagens de CAM, subdividindo-as em luminal, basal A, basal B, correspondentes aos subtipos luminal/HER2, basalóides e claudin-low, respectivamente (NEVE et al., 2006; KAO et al., 2009). Prat e colaboradores (2013) apontam ainda que os tumores poderiam ser divididos em: basalóides-símile e não-basalóides. Cumpre destacar, que, nessa classificação proposta por Prat et al., o subtipo basalóide-símile (basalóides e claudin-low) abrange a maioria dos tumores triplo-negativos. Entretanto nenhuma classificação dos tumores triplo-negativos teve impacto na decisão da escolha terapêutica evidenciando a urgência em determinar novas opções para o tratamento dessa doença heterogênea (SENKUS et al., 2015; HON et al., 2016).

### 1.2.3. Estratégias terapêuticas de controle do TNBC

As modalidades de tratamento para o TNBC podem ser divididas em locais (cirurgia e radioterapia) e sistêmicas (quimioterapia). A ressecção cirúrgica constitui o melhor método local para o controle do TNBC, que geralmente se apresenta como uma massa unifocal, densa e com margens regulares nos exames de ressonância magnética, tornando-o um bom candidato para a cirurgia de mama conservadora (revisado por YAGATA 2011). Contudo, os riscos de recorrência regional e loco-regional são maiores nas pacientes acometidas por TNBC do que nos outros subtipos (HAFFTY et al., 2006;

FREEDMAN et al., 2009). E, apesar dos impactos dessas recorrências tumorais na sobrevida ainda não serem claras, as mesmas afetam dramaticamente a qualidade de vida das pacientes. Geralmente, a indicação para a radioterapia após a mastectomia ocorre em pacientes acometidas por tumores maiores de 5 cm, com envolvimento marginal ou metástase nos linfonodos (revisado por MINAMI, CHUNG & CHANG, 2011). A utilização da radioterapia, portanto, limita-se aos casos de doença residual ou metastática.

A quimioterapia é a única terapia sistêmica para o TNBC, podendo ser dividida em neoadjuvante ou adjuvante. A quimioterapia neoadjuvante é a denominação do tratamento citotóxico anterior à cirurgia ou radioterapia, recomendada para os tumores em estadios avançados não operáveis e nos casos de doença metastática (revisado por VAKLAVAS & FORERO-TORRES, 2011).

Geralmente os tumores triplo-negativos são sensíveis à quimioterapia neoadjuvante, atingindo altas taxas de resposta patológica completa (pCR). Entretanto, a existência de doença residual implica em menor sobrevida e maior risco de recorrência da doença, quando comparado aos outros subtipos de CAM (ROUZIER et al., 2005; CAREY 2007; LIEDTKE et al., 2008; CORTAZAR et al., 2014). O tratamento citotóxico realizado nas pacientes com TNBC segue o preconizado para o CAM em geral, não apresentando regimes neoadjuvantes específicos às características desse subtipo extremamente heterogêneo, contribuindo assim para o cenário devastador dessa doença.

Os regimes baseados nas antraciclinas (epirrubicina e doxorrubicina) e/ou taxanos (docetaxel e paclitaxel) constituem o esquema neoadjuvante predominante no CAM (WU et al., 2011; CHEN et al. 2016). Cumpre ressaltar que diversos estudos clínicos estão sendo conduzidos para determinar a melhor combinação terapêutica, cronograma de administração e adição de novos agentes aos regimes neoadjuvantes corriqueiramente utilizados contra o TNBC.

A terapia adjuvante no TNBC se baseia no combate de micrometástases clinicamente não aparentes, nas quais as células estão propensas à expansão clonal culminando em recidiva da doença, após terapias loco-regionais, como a cirurgia e radioterapia (revisado por VAKLAVAS & FORERO-TORRES, 2011).

Nesse contexto, a realização do tratamento quimioterápico adjuvante após a cirurgia é indicado, principalmente, nos casos mais avançados da doença (KASHIWAGI et al., 2011). Similarmente à quimioterapia neoadjuvante, não existe nenhuma diretriz específica para tratamento citotóxico adjuvante dos tumores triplo-negativos (revisado por GOLDBIRSCH 2007), predominando a utilização dos regimes baseados em antraciclinas e/ou taxanos.

Recentemente, diversos estudos clínicos têm reportado a eficácia de regimes contendo o agente alquilante ciclofosfamida, em combinação com taxanos e antraciclinas (NAHLEH et al., 2016). Ademais, derivados de platina têm apresentado boas respostas clínicas no TNBC, especialmente nos tumores que apresentam mutação em BRCA1/BRCA2 (revisado por HURVITZ, MEAD, 2016). É importante ressaltar que as pacientes TNBC que não atingiram a resposta patológica completa (pCR) nesses estudos, estavam associadas à menor sobrevida e maior risco de recorrência da doença comparadas aos grupos não-TNBC, assim como o observado na terapia convencional baseada nos taxanos e/ou antraciclinas.

Como descrito anteriormente, os atuais regimes quimioterápicos empregados no TNBC não estão tratando satisfatoriamente a doença, além de apresentarem um grave perfil toxicológico às pacientes. Os taxanos possuem como principais efeitos adversos a neutropenia e severa neuropatia. Docetaxel está associado à retenção de líquidos, podendo causar edema periférico e edema pulmonar, nos casos mais graves (revisado por GUIMARAES et al., 2013). Além disso, docetaxel e paclitaxel podem ocasionar neurotoxicidade capaz de restringir seu uso para alguns pacientes. No que diz respeito às antraciclinas, o seu uso, especialmente a doxorrubicina, é associada ao desenvolvimento de cardiotoxicidade grave e irreversível (revisado por GUIMARAES et al., 2013).

### **1.3. QUIMIORRESISTÊNCIA**

Historicamente o fator limitante para o sucesso das terapias sistêmicas contra o câncer é a quimiorresistência. Apesar dos avanços na área da cancerologia, na era da terapia alvo e medicina personalizada, a resistência aos quimioterápicos continua configurando um grave problema. A quimiorresistência pode ser

dividida em: intrínseca (resistência primária) e adquirida (resistência secundária, adaptativa ou evasiva). Na área clínica o termo “resistência à terapia” é usualmente utilizado como sinônimo de “doença progressiva” (KERBEL et al., 1994; revisado por BHOSLE e HALL, 2009).

A resistência primária à quimioterapia ocorre quando o tumor não responde inicialmente ao regime terapêutico empregado, devido, entre outros fatores, à alterações genéticas, modificações no metabolismo e excreção de xenocompostos, hipóxia e baixa vascularização (revisado por BHOSLE e HALL, 2009). Já a resistência secundária ocorre após a exposição das células tumorais aos agentes quimioterápicos. Dentre os fatores propostos para a resistência secundária destacam-se a alteração no transporte do quimioterápico através da membrana plasmática, modificações nas enzimas-alvo, alterações no metabolismo das drogas, aumento nas vias de reparo do DNA, ativação de vias de sinalização pró-sobrevivência e/ou inativação das vias indutoras de morte e modificações no microambiente tumoral (WELDON et al., 2001; revisado por BHOSLE e HALL, 2009; THOMAS et al., 2013; TAYLOR et al., 2015).

#### **1.4 SENESCÊNCIA**

A senescência celular constitui outro mecanismo de resposta ao estresse que tem despertado interesse nos últimos anos devido ao seu papel dual na supressão tumoral e na progressão e quimiorresistência dos tumores (revisado por PÉREZ-MANCERA; YOUNG; NARITA, 2014).

Senescência celular é um processo fundamental relacionado a várias doenças associadas ao processo de envelhecimento e disfunção tecidual (doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes e declínio da função imunológica), resultado de uma complexa resposta ao estresse na qual as células perdem irreversivelmente a capacidade proliferativa, acompanhada por várias mudanças na expressão gênica (revisado por CAMPISI, 2013). Vários fatores podem desencadear uma resposta senescente como radiação, quimioterápicos, danos ao DNA, encurtamento dos telômeros, estresse oxidativo, ativação de oncogenes, injúria tecidual e remodelamento, e

alterações metabólicas (revisado por PÉREZ-MANCERA; YOUNG; NARITA, 2014; revisado por CHILDS et al., 2015).

Adicionalmente à perda da capacidade proliferativa as células senescentes apresentam características únicas que permitem a sua caracterização incluindo aumento do volume celular, morfologia “achatada” (*flattened*) com múltiplos vacúolos, acúmulo de grânulos de resposta ao estresse, mudanças na condensação e distribuição da cromatina, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), ausência de marcadores de proliferação, aumento da expressão de inibidores do ciclo celular (p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1</sup>) e superexpressão de  $\beta$ -galactosidase lisossomal (frequentemente referida como SA- $\beta$ -Gal [*senescent-associated  $\beta$ -galactosidase*]) (DIMRI et al. 1995; revisado por CAMPISI, 2013).

A senescência celular é considerada um mecanismo de defesa contra o desenvolvimento tumoral, pois provoca uma irreversível parada no ciclo celular, libera fatores autócrinos supressores tumorais, aumenta o infiltrado imunológico eliminando as células senescentes/transformadas, além de estimular o reparo tecidual (XUE et al., 2007; KANG et al., 2011; IANNELLO et al., 2013; DEMARIA et al., 2014).

Embora as células senescentes sejam incapazes de proliferar elas são metabolicamente ativas. Esse metabolismo aumentado serve como suporte para a liberação de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores de remodelação tecidual caracterizando o Fenótipo Secretório Associado à Senescência (SASP) (ACOSTA et al., 2008; COPPÉ et al., 2008; WAJAPYEYEE et al., 2008). Através do SASP um pequeno número de células no tecido (tipicamente menos de 20%) é capaz de exercer efeitos sistêmicos (CAMPISI e D'ADDA DI FAGAGNA, 2007). A descoberta do SASP trouxe a luz a complexidade de implicações da senescência celular no câncer. A natureza do fenótipo, os alvos moleculares e as vias celulares ativadas dependem do contexto celular, do tipo do estresse e do modelo estudado (Figura 3).

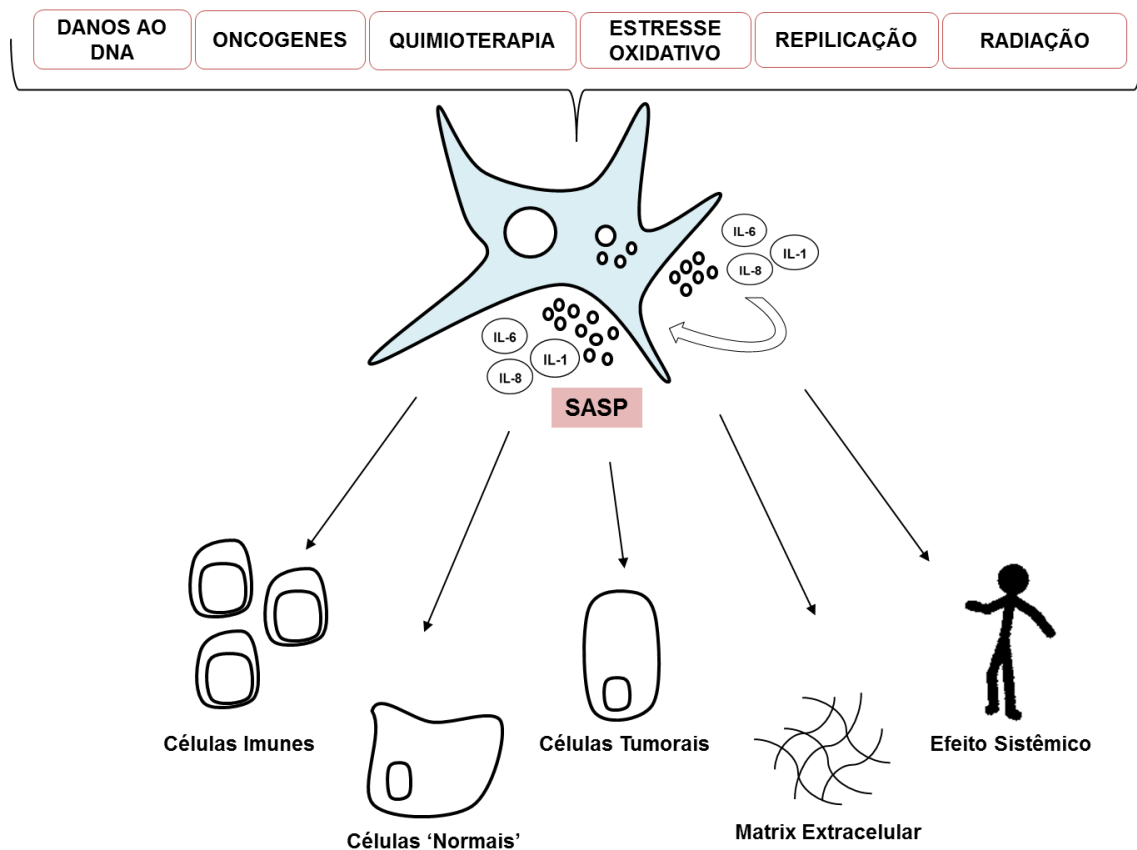


Figura 3 - Modelo esquemático da senescência celular e suas funções biológicas. A senescência celular apresenta papéis duais no desenvolvimento e reparo tecidual em contraponto com a tumorigênese, quimiorresistência e envolvimento em outras doenças como diabetes e doenças neurodegenerativas. Diversos fatores podem desencadear uma resposta senescente como radiação, quimioterápicos, danos ao DNA, encurtamento dos telômeros, estresse oxidativo, ativação de oncogenes, injúria tecidual e remodelamento, e alterações metabólicas.

Cumprir enfatizar que vários estudos observaram o fenótipo SASP em diferentes modelos celulares normais (fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais de mama, cólon, pulmão e pâncreas) e em células tumorais (câncer de mama, próstata, melanoma, gliomas, etc.). Adicionalmente, vários processos são capazes de induzir SASP incluindo a clássica senescência replicativa (SEN-REP), senescência induzida por dano ao DNA (DDIS), senescência induzida por oncogenes (OIS), senescência induzida por terapia (TIS) e senescência induzida por radiação (COPPE et al., 2008; OHANNA et al., 2011; MALAQUIN et al., 2013; MUNOZ-ESPIN et al., 2013)

Existem vários efetores do SASP dependentes do contexto e dos sinais extracelulares enviados. Esses efetores incluem fatores protumorigênicos (parácrino), imunomoduladores (parácrino), reforço da senescência (parácrino e autócrino) e modulação do microambiente (parácrino) (HOARE; YOUNG; NARITA, 2013). Os efeitos parácrinos incluem a promoção da transição epitélio mesênquima (EMT) e invasão, vascularização tumoral, mudanças morfológicas nas células tumorais, modulados principalmente por citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e metaloproteases (MMP3) (PARRINELLO et al., 2005; COPPÉ et al., 2006; COPPÉ et al., 2008; KUILMAN et al., 2008).

Células senescentes expressam diferentes componentes do SASP em diferentes estágios da progressão da senescência. Por exemplo, a expressão de IL-1 $\alpha$  é um dos eventos precoces depois da parada no crescimento celular e sua atividade autócrina induz a expressão de vários outros fatores do SASP como IL-6 e IL-8 via ativação do fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) e proteína ligante do potencializador CCAAT gamma (C/EBP $\beta$ ) (ORJALO et al., 2009; ACOSTA et al., 2013).

Estudos prévios indicaram que as células senescentes induzidas por drogas podem evadir a senescência dando origem à células altamente tumorigênicas (RADISKY et al., 2005; LEVINA et al., 2008; KARIMI-BUSHERI et al., 2010). Ademais, análises de amostras de tumores de mama de pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante anterior à cirurgia mostraram positividade para SA- $\beta$ -GAL e aumento da expressão de p16<sup>INK4a</sup> quando comparados com tumores não tratados (POELE et al., 2002). Webster e colaboradores (2015) estabeleceram o termo de pseudo-senescência para as células que expressam os clássicos marcadores de senescência (como SA- $\beta$ -GAL), focos de heterocromatina e não proliferam, porém são capazes de resistir à quimioterapia e adquirem um fenótipo altamente invasivo e pró-metastático. Adicionalmente, observou-se que o estresse oxidativo causado por quimioterápicos promovem o aparecimento de células senescentes em tumores e linhagens de câncer de mama das quais emergem uma população enriquecida de atividade de células tronco (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low</sup>), podendo explicar

como as células tumorais podem evadir à quimioterapia e provocar a repopulação do tumor (ACHUTHAN et al., 2011).

Em relação às abordagens farmacológicas, a inflamação associada ao SASP pode servir de alvo terapêutico suprimindo os efeitos protumorigênicos e quimiorresistentes relacionados com a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação da via do NFκB. Nesse contexto, o tratamento de fibroblastos humanos com glicocorticóides diminuiu a inflamação associada ao SASP (repressão da produção de IL-6 e diminuição da expressão de IL-1α e NFκB) não revertendo a supressão do crescimento celular em modelos de OIS e radiação (LABERGE et al., 2012). Semelhantemente, tratamento com metformina impediu a ativação da via do NFκB e diminuiu a expressão de IL-6, IL-8 e IL-1β em modelos de fibroblastos OIS, evidenciando as ações anti-inflamatórias da metformina (MOISEEVA et al., 2013).

Diante do exposto, é preciso compreender a dinâmica dos tratamentos quimioterápicos, principalmente no contexto do TNBC que não é suscetível ao emprego de terapias-alvo disponíveis comercialmente, além de apresentar elevado índice de recidiva da doença em detrimento a resposta inicial satisfatória aos antineoplásicos convencionais. Assim, a metformina vem despertando interesse nos tratamentos de diversos tipos de câncer, inclusive no TNBC, visto que estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram seu potencial antineoplásico modulando vias importantes relacionadas à proliferação, metabolismo e quimiorresistência.

## **1.5. METFORMINA**

A metformina (1,1-dimetil-bis-guanidina), tradicionalmente empregada no tratamento do diabetes (BAILEY & TURNER, 1996), despontou, nos últimos anos, como uma opção terapêutica contra o câncer de mama. O interesse pela metformina surgiu a partir da observação de estudos epidemiológicos, nos quais pacientes diabéticas com CAM em uso de metformina obtiveram respostas clínicas melhores do que aquelas usuárias de outros medicamentos hipo/euglicemiantes (BODMER et al., 2010; HE et al., 2012).



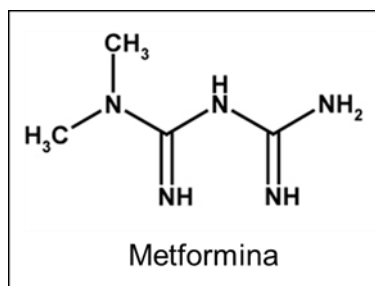


Figura 4 - Estrutura molecular da metformina.

Diversos estudos clínicos pré-cirúrgicos avaliaram o uso de metformina em pacientes não diabéticas com CAM. Niraula e colaboradores (2012), em um resultado preliminar com 39 pacientes, observaram decréscimo no marcador de proliferação celular, Ki67, e aumento na taxa de apoptose em mulheres não diabéticas recém diagnosticadas com CAM que utilizaram metformina (1500mg/dia) até a realização da cirurgia. Semelhantemente, Hadad e colaboradores (2012) relataram ligeiro decréscimo na expressão do Ki67 em mulheres não diabéticas com CAM operável que utilizaram metformina (1500mg/dia). Adicionalmente, esse estudo reportou alteração na expressão de vários genes envolvidos no metabolismo celular, inflamação e na sinalização de Proteína Cinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK) e Proteína alvo de rapamicina em mamífero (mTOR). Interessantemente, estudo envolvendo 200 pacientes não diabéticas com CAM operável demonstrou que o uso de metformina causou decréscimo no Ki67, apenas em mulheres com resistência à insulina (BONANNI et al., 2012).

Cumprir destacar, ainda, que a metformina é obtida a baixo custo e possui perfil tóxico moderado e bem estabelecido quando utilizadas nas doses hipoglicemiantes convencionais (DEFRONZO & GOODMAN, 1995). A metformina é amplamente distribuída entre os tecidos através de transportadores de cátions orgânicos e as ligações às proteínas plasmáticas não são significativas, além de ser excretada sem metabolização (Revisado por GONG et al., 2012). Utilizando-se doses clínicas da metformina (500 - 2000 mg) em humanos, a concentração plasmática máxima encontrada nos usuários é de 2,8 - 15  $\mu$ M (0,46 - 2,5 mg/L) (Revisado por STAMBOLIC et al., 2009).

O mecanismo de ação da metformina no câncer pode ser dividido em efeitos indiretos e diretos nas células tumorais. Os efeitos indiretos estão relacionados à habilidade da metformina de inibir fatores de transcrição-chave na gliconeogênese no fígado e aumentar a sensibilidade à insulina, reduzindo a concentração plasmática de glicose e os níveis de insulina circulantes (ALJADA & MOUSA, 2012). Essas ações indiretas são corroboradas por estudos epidemiológicos que relacionam o diabetes com maior risco de desenvolver câncer, inclusive o CAM (LARSSON, MANTZOROS & WOLK, 2007) (Figura 5).

Os efeitos diretos da metformina nas células neoplásicas parecem estar relacionados ao aumento intracelular da relação AMP/ATP em consequência da inibição do complexo I da cadeia respiratória (OWEN, DORAN, & HALESTRAP, 2000; HARDIE, 2006). Consequentemente a essa mudança na carga energética celular, a AMPK é ativada, modulando vias importantes relacionadas à proliferação, metabolismo, migração, transformação celular e à resistência aos quimioterápicos. Dentre as quais destacamos a via da Fosfatidil Inositol-3-Cinase/ Proteína Cinase B (PI3K), através da inibição de mTOR, via das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPK) por meio da redução da ativação da proteína cinase ERK e a via do NFκB (DOWLING et al., 2007; SOARES et al., 2013; MOISEEVA et al., 2013). Entretanto, várias evidências surgiram acerca de mecanismos celulares independentes de AMPK, geralmente associados ao aumento da taxa AMP/ATP e possíveis efeitos diretos (KALENDER et al., 2010).

Além desses mecanismos de ação propostos, vários estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a metformina diminuiu o crescimento tumoral em linhagens de câncer com fenótipo Células Tronco Tumorais/Transição Epitélio-Mesênquima (CSC/EMT) (VAZQUEZ-MARTIN et al., 2010; HIRSCH et al. 2009; ZHAO et al., 2014), clinicamente relacionadas à quimiorresistência celular aos tratamentos quimioterápicos convencionais, resultando em relapso da doença apesar da erradicação, mesmo aparente, da lesão primária (MOSERLE et al., 2010).

Adicionalmente, metformina inibe a sinalização de citocinas pró-inflamatórias que auxiliam na progressão do câncer, além de favorecerem a reprogramação

do microambiente tumoral promovendo o crescimento, plasticidade celular e quimiorresistência (MOISEEVA et al., 2013; ZHAO et al., 2014; LI et al., 2014).

Recentemente, foi descoberto que a metformina liga-se diretamente à proteína de alta mobilidade box 1 (HMGB1) inibindo as suas ações inflamatórias. HMGB1 é uma proteína multifuncional que desempenha papel de chaperona envolvida na regulação da expressão gênica, mas também induz inflamação através da sua ação extracelular em vários receptores, como os receptores do tipo-Toll 4 (TLR4). (HORIUCHI et al., 2017). Após a ativação do TLR4 há o recrutamento de MyD88 e outras moléculas adaptadoras que culminam na ativação de vias como NFκB e MAPK (revisado por PRADERE; DAPITO & SCHWABE, 2014). Cumpre enfatizar que foi investigada apenas as ações da metformina no bloqueio da atividade de citocina exercida por HMGB1 e futuros estudos são necessários para elucidar se a metformina pode afetar a função de regulação da cromatina e consequente modulação da expressão genica desempenhado por HMGB1.

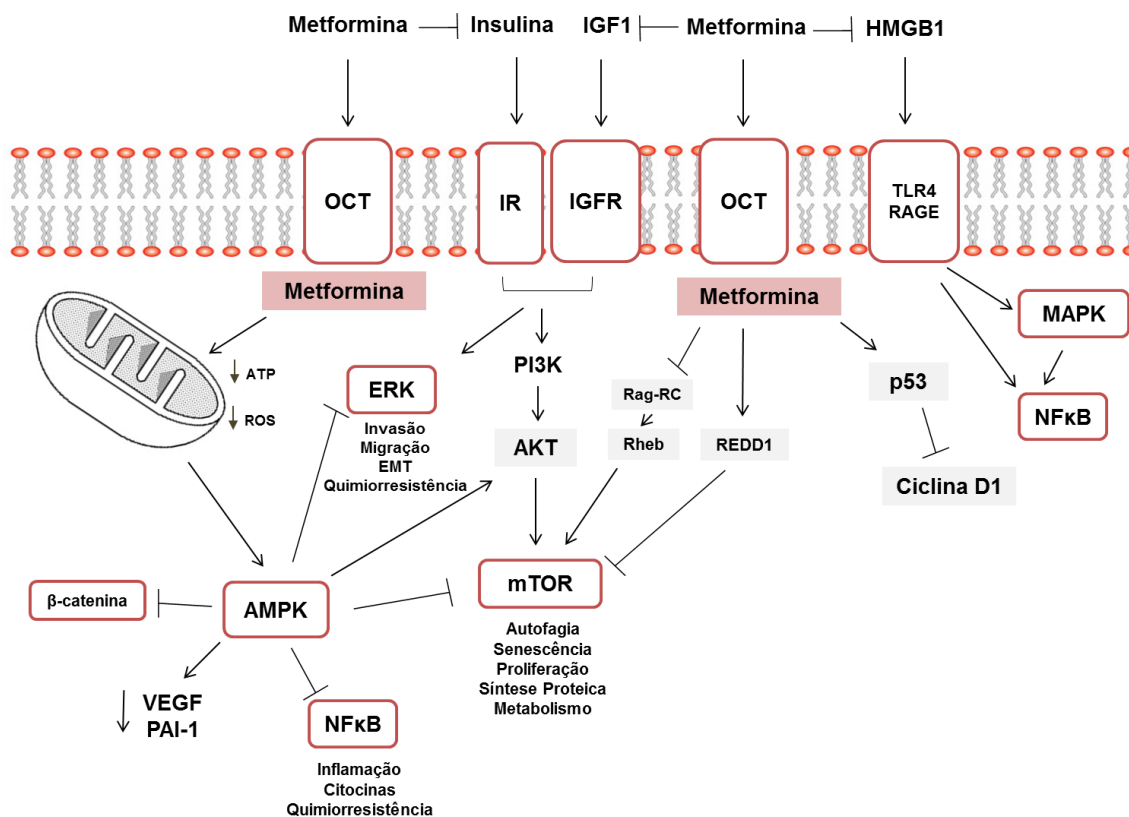


Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos de ação da metformina no câncer.

Siglas: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK); Extracellular signal-regulated kinase (ERK); High mobility group box 1 protein (HMGB1); Insulin-like growth factor 1 receptor (IGFR); Insulin receptor (IR); Mitogen-activated protein kinase (MAPK); Nuclear factor kappa B (NFκB); Organic cation transporter (OCT); Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1); Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K); Receptor for advanced glycation end products (RAGE); Protein regulated in development and DNA damage response 1 (REDD1); Ras homolog enriched in brain (Rheb); Toll-like receptor 4 (TLR4); Vascular endothelial growth factor (VEGF);

### **3. OBJETIVO GERAL**

Dada a relevância do subtipo TNBC, que congrega tumores majoritariamente agressivos e quimiorresistentes, a presente tese de doutorado objetivou investigar a eficácia antineoplásica e os mecanismos celulares de esquemas terapêuticos convencionais contendo metformina em linhagens celulares parentais e resistentes de TNBC.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para contemplar o objetivo geral proposto, estabelecemos os objetivos específicos, a saber:

- Investigar o benefício da terapia à base de metformina, em um painel de linhagens TNBC, com o intuito de confirmar a validade do uso de metformina, tanto em monoterapia quanto em terapias combinadas;
- Avaliar a viabilidade celular metabólica por meio do método do MTT;
- Avaliar a capacidade de formação de colônias;
- Estabelecer e caracterizar linhagens de CAM (Luminal e TNBC) resistentes ao paclitaxel com o objetivo de investigar o tratamento combinado de metformina e paclitaxel nas variantes resistentes na re-sensibilização ao taxano.
- Avaliar a viabilidade celular metabólica por meio do método do MTT e formação de colônias;
- Avaliar a morte celular por meio da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo;
- Avaliar as mudanças morfológicas e análise da senescência celular através do teste de coloração SA- $\beta$ -GAL;
- Avaliar a expressão de componentes regulatórios do ciclo celular, de membros da via do NF $\kappa$ B e de citocinas pró-inflamatórias por qPCR;
- Avaliar a expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> e CSC nas variantes resistentes por qPCR;

- Avaliar a secreção de IL-6 e IL-1 $\beta$  pelas células tumorais através do método de ELISA;
- Investigar a via de MAPK (ERK1/2), GSK-3 $\beta$ , mTOR/p70S6K, autofagia e apoptose na resistência ao paclitaxel

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Linhagens celulares, condições de cultivo e análise da morfologia celular**

Para a realização dos experimentos utilizou-se as seguintes linhagens de câncer de mama: MDA-MB-231 (Triplo-negativa / Basalóide B), HCC-1937 (Triplo-negativa / Basalóide A / Mutação em BRCA1), HCC-70 (Triplo-negativa / Basalóide A) e MCF-7 (Luminal A). Todas as linhagens foram mantidas em meio DMEM (Sigma, MO, EUA) suplementado com 0,2% (m/v) de bicarbonato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco/Invitrogen, NY, EUA), 1% (v/v) de solução estabilizada de Penicilina (100 unidades/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, NY, EUA) em estufa com condições controladas de temperatura (37°C), com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A morfologia celular foi observada utilizando microscópio Zeiss Observer Z1 e todas as imagens foram capturadas por meio do software Axio-Vision Rel. 4.8 software (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

### **4.2 Ensaio de viabilidade metabólica celular e cálculo de IC<sub>50</sub>**

O cálculo da concentração inibitória de 50% das células (IC<sub>50</sub>) foi realizado utilizando o método de determinação da viabilidade celular metabólica (VCM) através do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, MO, EUA). Vale ressaltar que o método de análise colorimétrica com o MTT permite mensurar o metabolismo celular pela redução deste sal por ação da succinato-desidrogenase mitocondrial, ocorrendo a formação de cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas.

Células de câncer de mama foram plaqueadas (1x10<sup>4</sup> células/poço) em placas de 96 poços e, após 24h de cultivo, foram tratadas com paclitaxel (PTX) (1nM-10µM), cisplatina (CDDP) (100nM-1mM), doxorubicina (DOX) (100nM-1mM), 5-fluorouracil(5-FU) (100nM-1mM) e metformina (MET) (10µM-100mM) por 24h e 48h. Posteriormente as células foram incubadas com 20µL da solução de MTT (5 mg/mL) por 4h. As placas foram então centrifugadas a 450 g e, para permitir a solubilização dos cristais de formazan, 100µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) foi

adicionado a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 538 nm, foi realizada em leitor de placas (MR-96 A, Bioclin, MG, Brasil). Como controle interno dos experimentos utilizou-se o excipiente (PBS 1X e/ou DMSO) em concentração e volume igual aos utilizados com as drogas nos ensaios. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Para o cálculo da IC<sub>50</sub> utilizou-se o software GraphPadPrism versão 5.0.

#### **4.3 Ensaio de formação de colônias**

Para avaliar a capacidade da metformina em inibir a formação de colônias e/ou diminuir o tamanho das colônias as células tumorais de mama foram plaqueadas ( $2 \times 10^2$  células/poço) em placas de 6 poços. Após 24h, as células foram tratadas com metformina (10µM-100mM) por 48h. Após esse período, procedeu-se com a lavagem dos poços e adição de meio novo (500µL). Após 15 dias de cultivo as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (p/v) e coradas com cristal violeta 1% (p/v). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica. A aquisição das imagens das colônias foi realizada utilizando Chemi-Doc® XRS System (Bio-Rad, CA, EUA).

#### **4.4 Avaliação da morte celular: marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (PI)**

A detecção de células em apoptose foi realizada pela marcação com Anexina V-FITC (Becton Dickinson, NJ, EUA) sendo as células em necrose identificadas com iodeto de propídeo (PI) (Sigma, MO, EUA). Foram plaqueadas  $3 \times 10^4$  células em placas de 6 poços. Após aderência, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, meio condicionado (60:40) da linhagem parental (MDA-MB-231) e meio condicionado (60:40) da linhagem MDA231-PR. Posteriormente realizou-se os tratamentos com paclitaxel e metformina. Após 48 horas, o meio foi coletado, as células lavadas com 1ml de PBS (também coletado e transferido para um tubo de citometria) e adicionados 350µl de solução de tripsina. A tripsina foi inativada com meio de cultura, o qual foi centrifugado a 800 g por cinco minutos, juntamente com o PBS anteriormente coletado. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspensos em 100µl de tampão de ligação contendo 10mM de HEPES (pH 7,4), 150mM de Cloreto de



Sódio, 5mM de Cloreto de Potássio, 1mM de Cloreto de Magnésio e 1,8mM de Cloreto de Cálcio e incubados com 0,1µg/µl de Anexina V- FITC e 0,1µg/µl de PI por 15 minutos no gelo e protegido da luz. Adicionou-se então 400µl de tampão de ligação. A aquisição das amostras foi realizada em citômetro BDAccuri® C6 FlowCytometer utilizando o canal FL1 e FL2. Um total de 10.000 eventos (células) foi adquirido por amostra e os dados analisados pelo software BDAccuri® C6 Software (Becton Dickinson, NJ, EUA).

#### **4.5 Indução de resistência nas linhagens de CAM**

A resistência ao paclitaxel nas linhagens de CAM foi desenvolvida utilizando uma estratégia em pulso ou choques (intermitente) com a finalidade de mimetizar a administração dos quimioterápicos na prática clínica. A variante MDA231-PR foi estabelecida em nosso laboratório a partir da linhagem parental triplo-negativa MDA-MB-231 enquanto a variante resistente MCF7-PR foi desenvolvida a partir da linhagem parental luminal MCF-7. As células tumorais de mama foram plaqueadas  $2 \times 10^6$  células em garrafas de 75cm<sup>2</sup>. Após confluência de 85% as células foram tratadas por 48h com paclitaxel (concentrações aumentavam em 2x a cada novo tratamento – iniciando com 0,8nM e finalizando com 100nM). Após esse período, procedeu-se com a lavagem das garrafas e adição de meio novo para a recuperação das células. Alíquotas das variantes eram congeladas antes de cada aumento na dose de paclitaxel. E após o estabelecimento da resistência e novo descongelamento as células recebiam três choques com doses crescentes de paclitaxel por 48h (16, 32 e 64nM) com períodos de recuperação entre os tratamentos.

#### **4.6 Análise da senescência celular: teste de coloração SA-β-GAL**

Para análise qualitativa da ocorrência de senescência celular foi utilizado o teste de coloração SA-β-GAL. Nesse ensaio colorimétrico é observado a superexpressão da enzima β-Galactosidase nos lisossomos em pH sub-ótimo (pH 6,0), processo que ocorre naturalmente durante o processo de senescência. A enzima degrada o X-GAL e o produto desta reação sofre uma oxidação convertendo-se em um composto insolúvel de cor azul, que se acumula na região perinuclear das células (DIMRI et al., 1995).

Foram plaqueadas  $3 \times 10^4$  células por poço em placas de 6 poços e as células foram incubadas durante 24h para adesão. As células foram lavadas com PBS e então fixadas com paraformaldeído 4% (m/v). Após a incubação para fixação, os poços foram lavados por duas vezes com PBS, e adicionou-se a solução de coloração contendo 1mg/mL de X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopiranosideo), 40mM de ácido cítrico/tampão fosfato (pH 6,0), 150mM cloreto de sódio, 2mM de cloreto de magnésio, 5mM ferrocianeto de potássio e 5mM ferricianeto de potássio overnight em incubadora a 37°C. Após este período, as células foram observadas em microscópio Zeiss Observer Z1 e todas as imagens foram capturadas por meio do software Axio-Vision Rel. 4.8 software (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

#### **4.7 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)**

A extração de RNA foi realizada com Trizol® (Invitrogen, NT, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Após deixar secar o precipitado, o mesmo foi ressuspensionado em 20 $\mu$ L de água DEPC (Pirocarbonato de dietila) (Sigma, MO, EUA). O RNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro Nanodrop-modelo ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Utilizou-se o kit SuperScript™ II RT (Bio-Rad, CA, EUA) para a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de 1 $\mu$ g de RNA previamente extraído. O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi realizado em termociclador ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) com o sistema de detecção SYBR Green I (Ludwig Biotec, RS, Brasil). As sequências dos iniciadores (*primers*) utilizados estão resumidos na Tabela 2. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como gene de referência. A quantificação relativa dos níveis de mRNA foi realizada usando o método comparativo Cq ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ).

Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados no qPCR.

<b>Gene</b>	<b>Sequência (5' →3')</b>
<b>IL1<math>\alpha</math></b>	Senso: CATCCTCCACAATAGCAGACAG Anti-senso: GAGTTTCCTGGCTATGGGATAAG
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Senso: CAAAGGCGGCCAGGATATAA Anti-senso CTAGGGATTGAGTCCACATTCAG
<b>IL8</b>	Senso: CTTGGCAGCCTTCCTGATTT Anti-senso GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG
<b>IL6</b>	Senso: CATTTGTGGTTGGGTCAGG Anti-senso AGTGAGGAACAAGCCAGAGC
<b>P70S6K</b>	Senso: TACTTCGGGTACTTGGTAA Anti-senso: GATGAAGGGATGCTTTACT
<b>NANOG</b>	Senso: GCCCTGCACCGTCACCC Anti-senso: ACCAGGTCTTCACCTGTTTGT
<b>ESA</b>	Senso: CGGGACCAGTTTGCCAAG Anti-senso: GCCAATGTCAGCATCTCTCT
<b>CD24</b>	Senso: GCTACTGTGTGTGTGAATGA Anti-senso: TTTTTTTGCTCTTTCAGCCATT
<b>CD44</b>	Senso: GCTACCACTTTGATGACGAC Anti-senso: CGTACCAGCCATTTGTGTTG
<b>CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>)</b>	Senso: GTGAGAGTGGCGGGGTC Anti-senso: GTTACGGTCGGAGGCCG
<b>CDKN1A (p21<sup>WAF1</sup>)</b>	Senso: CATGGGTTCTGACGGACAT Anti-senso: AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC
<b>CDKN1B (p27<sup>kip1</sup>)</b>	Senso: CATTCCATGAAGTCAGCGAT Anti-senso: CGTCAAACGTAAACAGCTCG
<b>GAPDH</b>	Senso: CAGCCTCAAGATCATCAGCA Anti-senso: ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT

#### **4.8 Estudo da secreção de citocinas pró-inflamatórias através de ELISA**

A concentração das proteínas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no sobrenadante das linhagens celulares MDA-MB-231 e da variante resistente, MDA231-PR, foi avaliada por ELISA. Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células em frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Após 24 horas, os meios foram coletados e então acrescentados meio novo. Passadas mais 24h o sobrenadante foi coletado novamente. Foram realizadas 10 coletas de sobrenadante para a obtenção do *pool*, centrifugados para a remoção de debris e mantidos a -80°C até o momento da análise. A concentração das proteínas IL-1 $\beta$  (eBioscience, CA, EUA), IL-6 (Peprotech, NJ, EUA) e TNF- $\alpha$  (eBioscience, CA, EUA) foi determinada conforme as instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em triplicata e a concentração de citocinas no sobrenadante da cultura celular foi calculada por meio da equação de regressão linear construída a partir da curva padrão para cada citocina. Todas as análises foram realizadas no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro em parceria com a Dra. Morgana Teixeira Lima Castelo Branco.

#### **4.9 Immunoblotting**

##### **4.9.1 Preparo das amostras**

Células das linhagens de CAM foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL em garrafas de 25cm<sup>2</sup> em meio DMEM suplementado sob as condições de cultivo padrão. Após 48h as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e então extraídas com tampão de extração RIPA (Tris-HCL pH 7.4 50 mM, Cloreto de Sódio 150mM, 1%Triton 100X, 0,5% Deoxicolato de sódio e SDS 0,1%) adicionado de inibidores de fosfatase e proteases Roche's cOmplete™ (Sigma, MO, EUA). O lisado celular foi transferido para eppendorfs e mantido no gelo por 30 minutos, e então centrifugado por 15 minutos a 9000 *g* a 4°C. O sobrenadante correspondente a proteínas totais foi armazenado a -80°C para posterior utilização. A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de BCA (ensaio do ácido bicinconínico) (BioAgency, SP, Brasil) em duplicata. A curva padrão foi construída utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão nas concentrações 0,75; 1,5; 3,0; 9 e 15 e 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , em microplaca de 96 poços. Para o ensaio foram adicionados

em cada poço, 10 µL da proteína e água e 190 µL do Reagente BCA e posteriormente incubado a 37°C por 30min. A leitura foi realizada em leitor de placas (MR-96 A, Bioclin, MG, Brasil) em 562nm. Após a quantificação das proteínas, as amostras foram transferidas para outros tubos, onde receberam tampão de amostra composto por Tris 0,76% (p/v); glicerol 12,5% (v/v); SDS 2,3% (p/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,19% (p/v). A mistura foi aquecida por 15 minutos à 95°C, estando pronta para a aplicação no gel de eletroforese.

#### 4.9.2 Corrida Eletroforética

A técnica de SDS-PAGE foi utilizada como a primeira etapa da técnica de Western Blot com o objetivo de separar as proteínas do lisado celular de acordo com o seu peso molecular. No gel SDS-PAGE 10%/12% (p/v) foram aplicados aproximadamente 50µg de proteína paralelamente a um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue, 10-250kD) (Bio-Rad, CA, EUA). Uma vez aplicadas as amostras e o padrão de peso molecular, o gel foi submetido a uma voltagem de 90V numa solução de corrida, composta por Tris base 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v) e SDS 0,01% (p/v). Após a separação das proteínas presentes no lisado celular, o gel foi submetido à técnica de Western Blot para a identificação das proteínas de interesse.

#### 4.9.3 Western-Blot

Terminada a corrida eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Sequi-Blotim PDVF membrane for protein sequencing, 0,2µm, Bio Rad, EUA) por 2 hora, a 200 mA, em um tampão de transferência composto de tris 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v) e metanol 15% (v/v). Após a transferência, a membrana foi mantida em agitação por 1 hora, à temperatura ambiente, numa solução composta por leite desnatado sem gordura 5% (p/v) e PBS-NP40 0,05% (p/v). Depois de lavada 3 vezes com PBS-NP40 0,05% (p/v), a membrana foi incubada durante a noite com anticorpo específico para a proteína de interesse (os anticorpos utilizados estão especificados na Tabela 3). Na etapa seguinte, a membrana foi lavada e incubada por 50min com o anticorpo secundário, que se liga especificamente ao anticorpo primário utilizado, sendo posteriormente lavada 3 vezes com PBS-

NP40 0,05% (p/v). Posteriormente, as membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando o kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham). As imagens foram adquiridas no Chemi-Doc® XRS System e analisadas utilizando o software ImageLab (Bio-Rad, CA, EUA).

Tabela 3: Descrição dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de análise da expressão proteica.

<b>Anticorpos</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>
<b>ERK</b>	Cell Signaling	1:500
<b>pERK</b> <sup>T202/Y204</sup>	Cell Signaling	1:500
<b>GSKβ</b>	Cell Signaling	1:500
<b>pGSKβ</b> <sup>SER9</sup>	Cell Signaling	1:500
<b>p70S6K</b> <sup>T421/S424</sup>	Cell Signaling	1:500
<b>Bax</b>	Becton Dickinson	1:500
<b>Beclina</b>	Cell Signaling	1:500
<b>LC3B</b>	Cell Signaling	1:500
<b>GAPDH</b>	Cell Signaling	1:4000

#### 4.8 Análise estatística

Todos os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experimentos realizados em triplicatas ou quadruplicatas biológicas. Análises para identificar diferenças estatísticas entre dois grupos experimentais foram realizadas através de Teste t de Student não-pareado. Adicionalmente, as análises para identificar diferenças estatísticas entre três ou mais grupos em experimentos com uma variável foram realizadas através de análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Bonferroni. Análises para identificar diferenças estatísticas entre três ou mais grupos em experimentos com duas variáveis foram realizadas através de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Os testes estatísticos utilizados em cada um dos experimentos estão indicados na legenda das figuras. Um valor  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (\* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,

$P \leq 0,001$ ). As análises foram realizadas no *software* GraphPadPrism v.5 para Windows (versão 5.00.288).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Efeito da metformina em monoterapia na proliferação celular e formação de colônias em linhagens de TNBC e Luminal.**

Dados da literatura têm demonstrado que a metformina é eficaz contra subtipos diferentes de CAM, sendo seu efeito independente da expressão de RE, RP, HER2 ou p53 pelas células tumorais. Por isso, tem-se atribuído benefício clínico ao uso de metformina como boa opção terapêutica contra tumores mamários de modo geral (ALIMOVA et al., 2009; LIU et al., 2009). Esses dados são corroborados por estudos prévios realizados por nosso grupo que assinalam para a redução significativa da proliferação celular tanto na linhagem TNBC MDA-MB-231 quanto na linhagem luminal A MCF-7 na presença da metformina (GUIMARÃES, 2013)

Motivados pelos nossos resultados experimentais, prosseguimos com os estudos focando, a partir deste momento, no efeito promissor da metformina no tratamento do TNBC. Com o intuito de entendermos melhor o efeito da metformina no tratamento dos tumores triplo-negativos, realizamos experimentos de dose-resposta de seu efeito antiproliferativo e avaliamos a capacidade de formação de colônias, em intervalo de concentrações que compreendem desde aquela empregada no tratamento do diabetes (10uM) até 100mM nas linhagens tumorais TNBC HCC70, HCC1937 e MDA-MB-231, e na linhagem Luminal A MCF-7 (Figura 6).



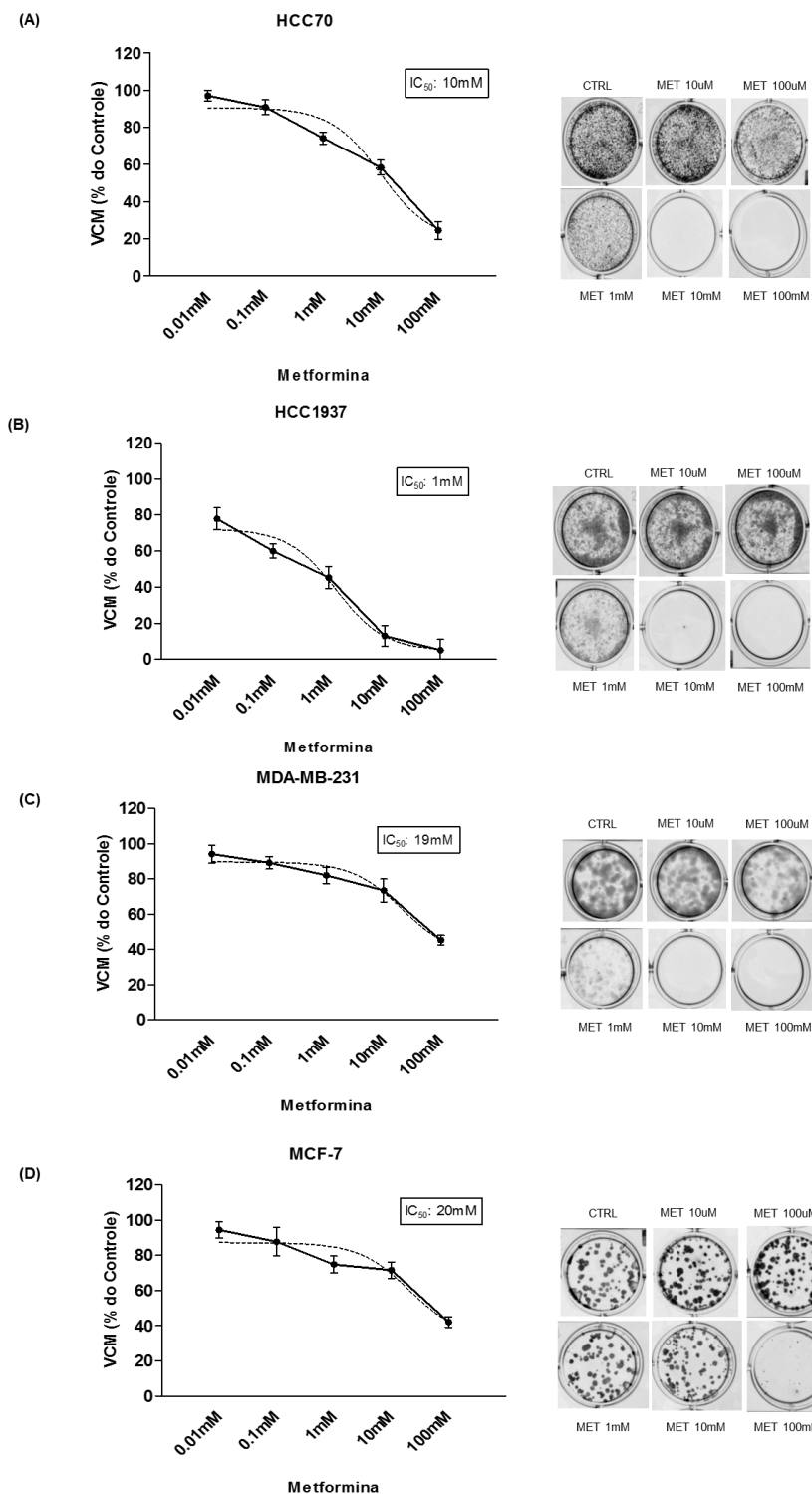


Figura 6 – Avaliação da inibição da proliferação celular da Metformina em linhagens de CAM. Análise da inibição da proliferação celular e formação de colônias de tratamento com metformina nas linhagens de câncer de mama (A) HCC70, (B) HCC1937, (C) MDA-MB-231 e (D) MCF-7. As células foram tratadas com metformina em concentrações que variavam de 10uM a 100mM por 48 horas. A proliferação celular foi mensurada através de ensaio de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média $\pm$ SD (n=4). E a formação de colônias foi observada após 15 dias de cultivo (figuras representativas de 3 experimentos independentes). As linhas pontilhadas representam o cálculo da regressão linear.

Como pode ser verificado por meio dos dados expostos na Figura 6, a metformina inibiu a proliferação celular nas linhagens analisadas de forma dose-dependente e as linhagens TNBC HCC70 e HCC1937 foram mais sensíveis aos efeitos inibitórios da biguanida com valores de IC50 de 10mM e 1mM, respectivamente. Adicionalmente à inibição da proliferação, metformina foi capaz de reduzir a formação de colônias nas linhagens de CAM. Cumpre ressaltar que nas linhagens TNBC tratamento com metformina 10mM impediu o crescimento de colônias enquanto que na linhagem luminal (MCF-7) pode-se observar colônias mesmo utilizando doses dez vezes maiores de metformina (100mM) (Figura 6). Nossos achados são consistentes com o estudo de Liu e colaboradores (2012) que reportaram maior sensibilidade na linhagem triplo-negativa à metformina quando comparada a outros subtipos histológicos do CAM.

## **5.2 Efeito da metformina em combinação com quimioterápicos na proliferação celular de linhagens TNBC e Luminal.**

A partir dos resultados anteriores, investigamos o impacto da adição da metformina aos tratamentos com os quimioterápicos convencionais utilizados na terapia do CAM, doxorrubicina e paclitaxel, e cisplatina.

Conforme mencionado anteriormente o TNBC não possui um protocolo de tratamento estabelecido. Os principais centros de tratamentos oncológicos (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) e a Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO)) recomendam o emprego da quimioterapia (monoterapia ou politerapia) no tratamento dos tumores, entretanto não estabelecem os melhores agentes antineoplásicos, preconizando apenas que os regimes sejam baseados em fatores relacionados à doença (terapias prévias, crescimento tumoral e doença metastática, por exemplo) e aos pacientes (idade e comorbidades, por exemplo) (SENKUS et al., 2015; ANDREOPOULOU et al., 2017).

É importante salientar que, diversos estudos clínicos verificaram que os regimes baseados em taxanos e antraciclinas são efetivos no tratamento do TNBC (HENDERSON et al., 2003; HARRIS et al., 2006; BIANCHINI et al.,

2016). A adição dos taxanos nos regimes quimioterápicos aumentou a eficácia da quimioterapia, independentemente da idade, comprometimento dos linfonodos, tamanho do tumor ou estadiamento, entretanto aumentou as toxicidades não cardíacas (SENKUS et al., 2015). Estudos recentes verificaram que o uso sequencial de doxorubicina e paclitaxel é superior ao uso concomitante e evidências sugerem que o uso dos taxanos anteriormente ao das antraciclinas é mais efetivo que o uso tradicional (antraciclinas-taxanos) (SHAO et al., 2012; EARL 2014; SENKUS et al., 2015).

Entretanto, o TNBC é caracterizado pelo elevado índice de relapso da doença em detrimento da responsividade inicial aos antineoplásicos convencionais (taxanos e antraciclinas) (ROUZIER et al., 2005; CAREY 2006). Sendo assim, há urgência na identificação de substâncias alternativas capazes de controlar o progresso da doença.

Os compostos de platina (cisplatina, carboplatina, etc.) têm sido explorados na terapia do TNBC, especialmente em tumores com mutação em BRCA1/BRCA2 e com deficiências na via de reparo de DNA (revisado por GERRATANA et al., 2016). Estudos clínicos observaram que a adição de carboplatina na terapia (neo)adjuvante aumentou as taxas de pCR, entretanto os dados de sobrevida ainda são conflitantes (revisado por HURVITZ & MEAD, 2016). A citotoxicidade dos compostos de platina é atribuída à formação de adutos de Pt-DNA que levam à alterações estruturais do DNA, desencadeando a ativação de vias de reparo de DNA, inibição do ciclo celular e apoptose (KELLAND, 2007).

Embora vários estudos *in vitro* em diferentes modelos celulares de câncer tenham determinado o benefício da combinação de metformina com quimioterápicos, a maioria dos trabalhos utilizou doses suprafisiológicas da metformina (LIU et al., 2012; WANG et al., 2017; XUE et al., 2017). Estudos farmacocinéticos com metformina revelaram que a concentração plasmática máxima encontrada nos pacientes diabéticos variavam entre 2,8 a 15uM (0,46 - 2,5 mg/L) (DOWLING et al., 2016). Assim utilizamos doses clinicamente relevantes de metformina, com perfil de toxicidade modesto, na condução dos nossos estudos.

Avaliamos então a proliferação celular de tratamentos utilizando paclitaxel, doxorrubicina e cisplatina em monoterapia e combinados com dose clinicamente relevante de metformina (10 $\mu$ M), pelo método de MTT. Como pode ser verificado por meio dos dados expostos nas Figuras 7, 8 e 9 a adição da metformina ao tratamento com doxorrubicina e paclitaxel potencializou significativamente a inibição da proliferação celular causada pelos quimioterápicos, entretanto o mesmo efeito não foi observado quando combinamos cisplatina e metformina nas linhagens TNBC HCC70 e MDA-MB-231; e Luminal A MCF-7.

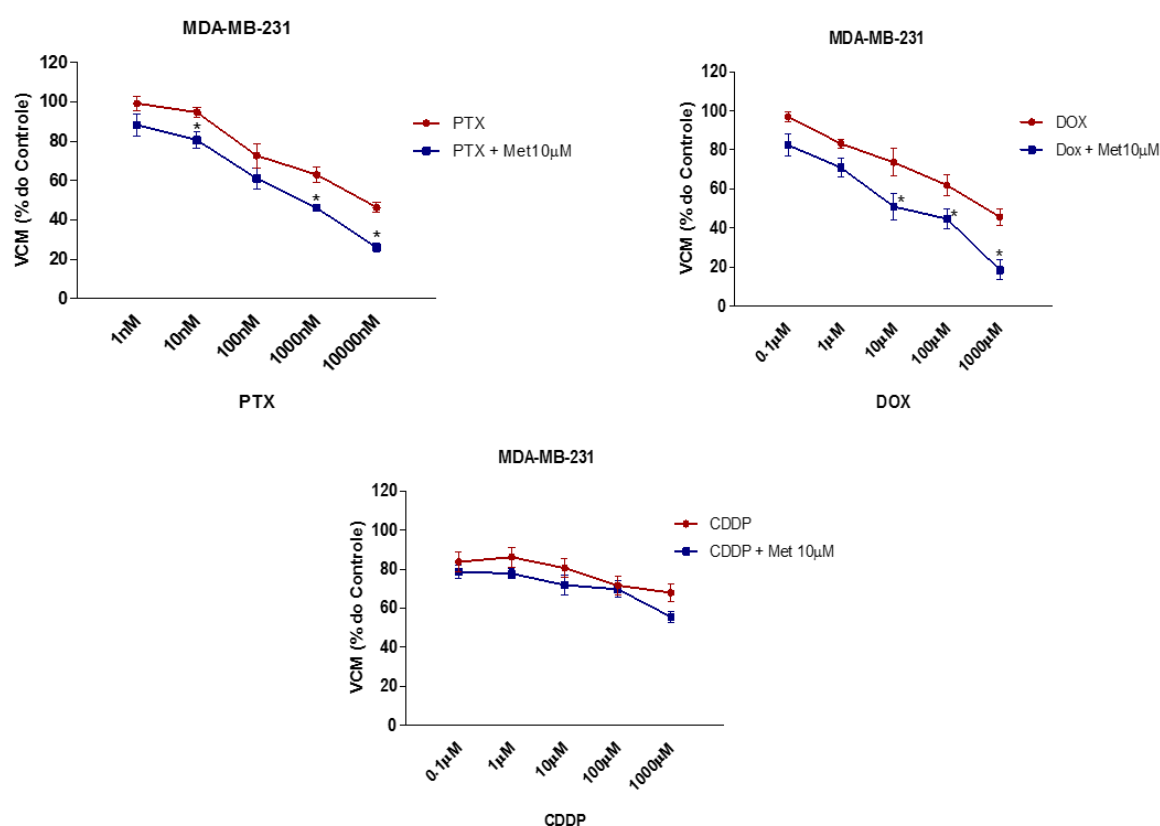


Figura 7 - Efeitos do paclitaxel, doxorrubicina e cisplatina em monoterapia e combinados com 10 $\mu$ M de metformina por 48h na proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 avaliado pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média $\pm$ SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. \* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ;

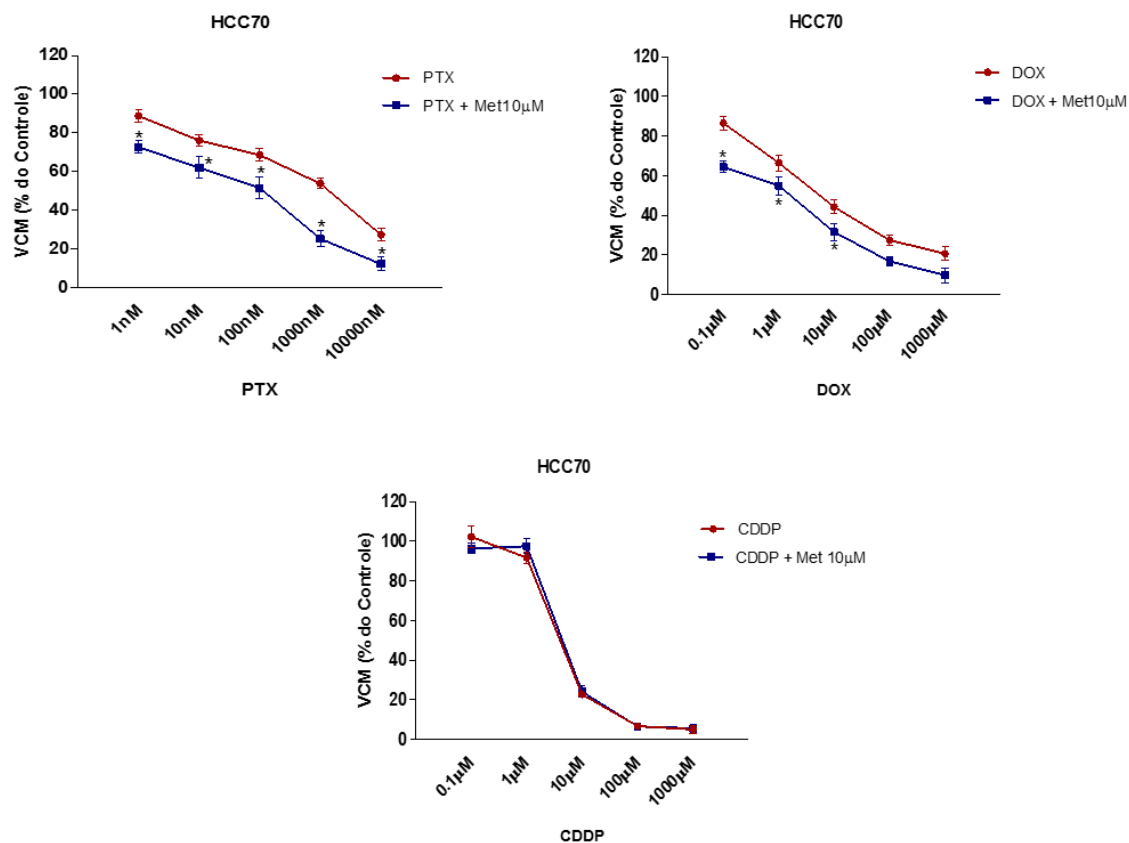


Figura 8 - Efeitos do paclitaxel, doxorrubicina e cisplatina em monoterapia e combinados com 10µM de metformina por 48h na proliferação celular da linhagem HCC70 avaliado pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. \* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ;

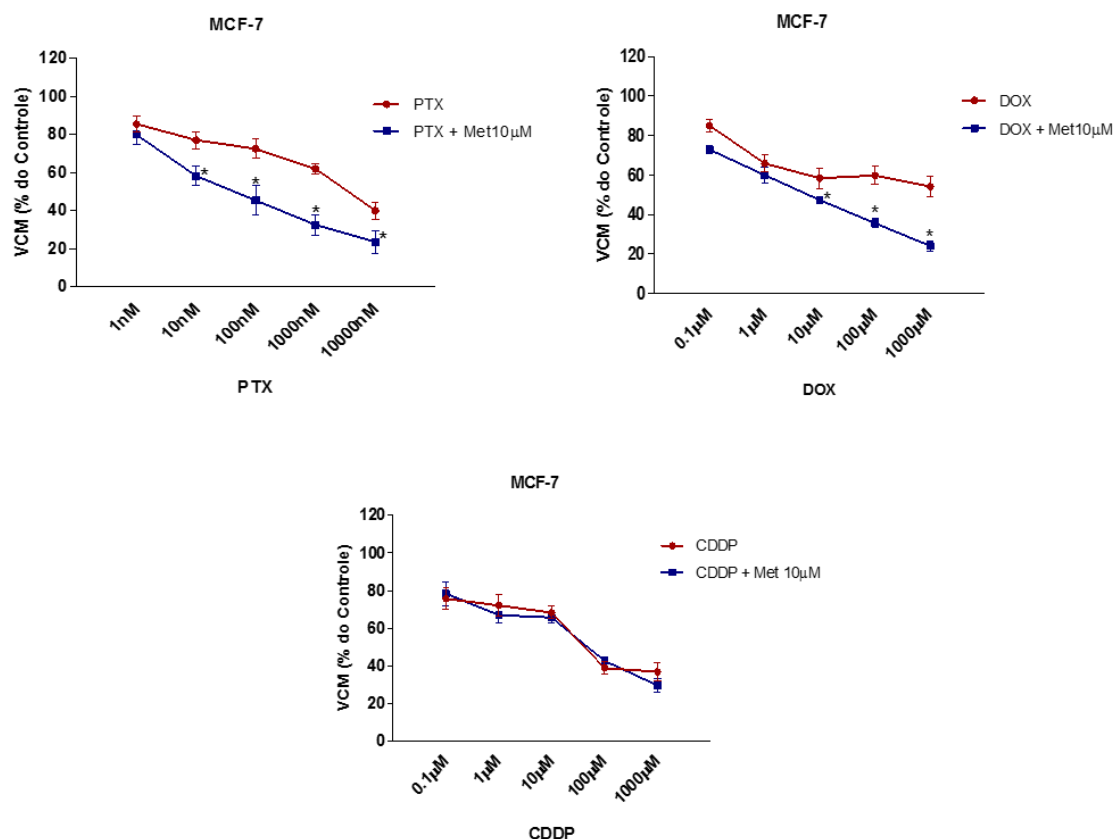


Figura 9 - Efeitos do paclitaxel, doxorrubicina e cisplatina em monoterapia e combinados com 10μM de metformina por 48h na proliferação celular da linhagem MCF-7 avaliado pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. \* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ;

O cotratamento utilizando paclitaxel e metformina nas linhagens triplo negativas potencializou a inibição da proliferação celular causada pelo taxano em todas as doses testadas (Figuras 7 e 8). Ressaltamos a importância da combinação no que diz respeito à diminuição da dose do paclitaxel para atingir os mesmos efeitos biológicos, conferindo à paciente de CAM maior possibilidade de tolerar o tratamento por não aumentar as chances de desenvolvimento de neurotoxicidade. Corroborando com os nossos achados, Qu e colaboradores (2014) observaram que a adição de metformina 10μM ao tratamento com paclitaxel potencializava o efeito do antiproliferativo do quimioterápico na linhagem MDA-MB-231 e na linhagem resistente à múltiplas drogas MCF-7/5FU.

Podemos observar que os regimes combinados entre a doxorrubicina e a metformina também provocaram redução na proliferação celular em todas as concentrações da antraciclina testadas (Figuras 7, 8 e 9). O desenvolvimento de cardiopatias severas e irreversíveis associadas ao uso da doxorrubicina já está bem estabelecido na prática clínica. Kobashigawa e colaboradores (2014) observaram que metformina em doses baixas (micromolares) exerciam efeitos cardioprotetores em modelos de cardiopatia causados por doxorrubicina via ativação de AMPK. Outro estudo mostrou que o pré-tratamento com metformina conferiu proteção cardíaca e melhora nos marcadores histopatológicos nos ratos que receberam tratamentos com a antraciclina (KELLEN; AMIN & ABDELRAHMAN, 2015). Assim, a adição de metformina nos esquemas antineoplásicos baseados em antraciclinas pode conferir benefícios extra proliferativos, como a proteção cardíaca.

A combinação de cisplatina e metformina nos nossos modelos *in vitro* não conferiu benefício em relação à inibição da proliferação celular comparada ao derivado de platina em monoterapia (Figuras 7, 8 e 9). Observamos o mesmo fenômeno ao realizar tratamentos com metformina em doses clinicamente relevantes com cisplatina na linhagem de câncer de ovário A2780. Entretanto notamos que a adição da metformina nos tratamentos com cisplatina inibiu a proliferação na linhagem resistente à cisplatina ACRP em níveis semelhantes ao da linhagem parental A2780 (GUIMARAES et al., 2017). Há diversos estudos documentando ensaios de avaliação da atividade antineoplásica da terapia combinada composta por cisplatina e metformina em doses clinicamente relevantes em diferentes modelos de câncer (ERICES et al., 2013; CHEN & CHEN, 2015; QI et al., 2016), porém não há estudos em modelos de câncer de mama. Assim, novas análises devem ser conduzidas para determinar a melhor estratégia na adição de metformina nos tratamentos com a cisplatina no TNBC.

Como descrito anteriormente, os regimes quimioterápicos atualmente empregados no tratamento do TNBC estão associados a índices elevados de toxicidade, além do desenvolvimento da quimiorresistência. Assim, esquemas terapêuticos que permitam a diminuição das doses utilizadas da droga e/ou evitem o aparecimento da resistência são de grande valia na clínica oncológica.

### **5.3 Estabelecimento de linhagens de CAM resistentes ao paclitaxel**

Quimiorresistência é o principal fator envolvido na falha terapêutica e baixa sobrevida dos pacientes com CAM. Constitui um fenômeno complexo envolvendo vários mecanismos que precisam de elucidação, principalmente no que tange ao tratamento com taxanos e antraciclinas nos tumores triplo-negativos. O desenvolvimento de linhagens resistentes tem sido amplamente utilizado para investigar os mecanismos de citotoxicidade e resistência aos quimioterápicos (KARS et al., 2006; WIND & HOLEN, 2011; MCDERMOTT et al., 2014).

Existem diversos modelos propostos para o estabelecimento de linhagens tumorais resistentes aos quimioterápicos e os principais são os tratamentos intermitentes (pulsos) e tratamentos contínuos. O modelo de tratamento intermitente mimetiza os ciclos de quimioterapia permitindo a recuperação em meio livre de droga após os choques com o fármaco, estabelecendo variantes com baixos índices de resistência (2 a 5 vezes) e mudanças moleculares modestas. Por sua vez, os tratamentos contínuos utilizam doses altas do quimioterápico e os clones selecionados crescem na presença de droga, obtendo-se modelos de resistência mais estáveis e com grandes mudanças biológicas (MCDERMOTT et al., 2014)

Com o intuito de simular os ciclos de tratamentos das pacientes com tumores triplo-negativos estabelecemos protocolo de tratamento intermitente com o paclitaxel nos nossos estudos, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos.

É reconhecido que o paclitaxel acumula-se no interior das células podendo alcançar até 1000 vezes mais a concentração obtida no plasma, dependendo do tipo celular e da concentração de taxano administrada. Estudo recente demonstrou que, em pacientes com CAM, enquanto a concentração plasmática do taxano variava de 80-280nM, a concentração intratumoral atingia 1,1-9µM, representando um aumento de 4 a 70 vezes (ZASADIL et al., 2014). Adicionalmente, Zasadil e colaboradores (2014) mensuraram a concentração de paclitaxel na linhagem MDA-MB-231, por HPLC, após vinte horas de tratamento com o taxano e observaram um acúmulo intracelular de 42 a 1600



vezes (doses do tratamento variaram de 0,005 $\mu$ M a 10 $\mu$ M de paclitaxel). Assim, doses nanomolares de paclitaxel conseguem mimetizar as concentrações intratumorais encontradas nos pacientes.

Cabe enfatizar ainda, que a maioria dos estudos farmacocinéticos encontrou, na média, doses plasmáticas máximas de 5 $\mu$ M de paclitaxel em pacientes realizando ciclos de terapia com a dose usualmente empregada de 175 mg/m<sup>2</sup> por 3h de infusão (HUNZ et al., 2007; revisado por STAGE, BERGMANN & KROETZ, 2017). Em concordância com as informações estabelecidas na literatura, utilizamos doses de paclitaxel consistentes com as concentrações obtidas clinicamente em pacientes tanto no estabelecimento das variantes resistentes quanto na condução dos estudos posteriores (doses variando de 10nM a 5 $\mu$ M).

Como pode ser verificado por meio dos dados expostos nas figuras 10 e 11, obtivemos com sucesso variantes resistentes ao paclitaxel (MDA231-PR e MCF7-PR). A linhagem triplo-negativa MDA231-PR apresentou IC<sub>50</sub> 4,3 vezes maior do que a linhagem parental (0,99 $\mu$ M para MDA-MB231 vs 4,3 $\mu$ M para MDA231-PR) enquanto que a linhagem luminal MCF7-PR exibiu IC<sub>50</sub> 7 vezes maior que a linhagem parental (0,17 $\mu$ M para MCF-7 vs 1,12 $\mu$ M para MCF-7). Nossos dados estão em consonância com os achados de McDermott e colaboradores (2014) que ao comparar linhagens obtidas de pacientes antes e depois da quimioterapia observaram que em média a IC<sub>50</sub> das linhagens pós ciclos de tratamento estavam de 2 a 5 vezes maiores do que nas linhagens obtidas pré-quimioterapia.

As linhagens resistentes apresentaram alterações morfológicas marcantes quando comparadas às linhagens parentais. Em ambos os modelos de resistência observamos um aumento no volume celular, morfologia “achatada” com múltiplos vacúolos e extensa pseudopodia (extensões citoplasmáticas) (Figura 10C e 11C). Notamos ainda que as linhagens resistentes exibiam um perfil de crescimento lento quando comparado às linhagens parentais.

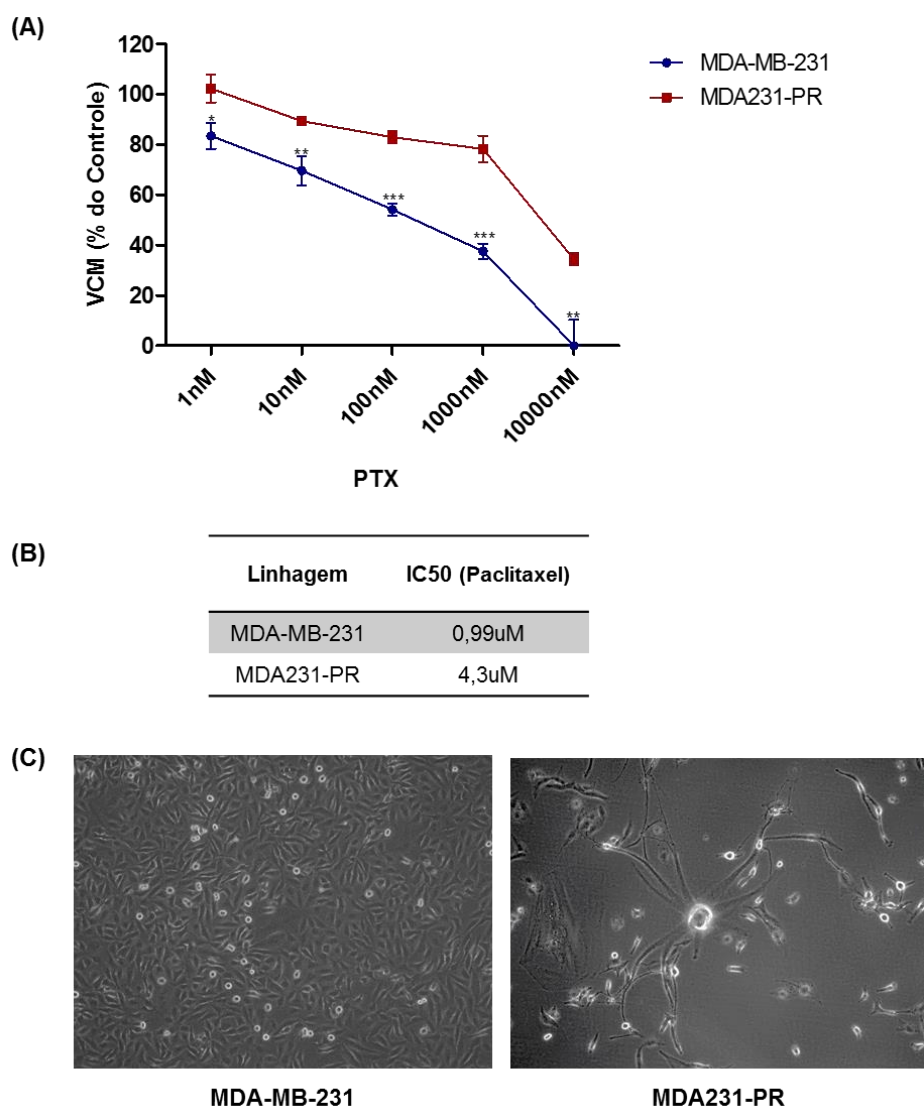


Figura 10 - Estabelecimento da linhagem resistente ao paclitaxel. (A) Análise da inibição da proliferação celular do PTX na linhagem de CAM MDA-MB-231 e a variante gerada após exposição com PTX (MDA231-PR). As linhagens de CAM foram plaqueadas em placas de 96-poços e incubadas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. As células foram tratadas com PTX em concentrações que variavam de 1nM a 10uM por 48 horas. A proliferação celular foi mensurada através de ensaio de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste t de uma via não pareado foi realizado. \* indica P≤0,05; \*\*, P≤0,01; \*\*\*, P≤0,001 (B) Valores de IC<sub>50</sub> determinados após tratamento de 48h com PTX. (C) Microfotografias realizadas em microscópio ótico invertido em aumento de 10x evidenciando a alteração morfológica na variante gerada após exposição ao PTX (MDA231-PR)

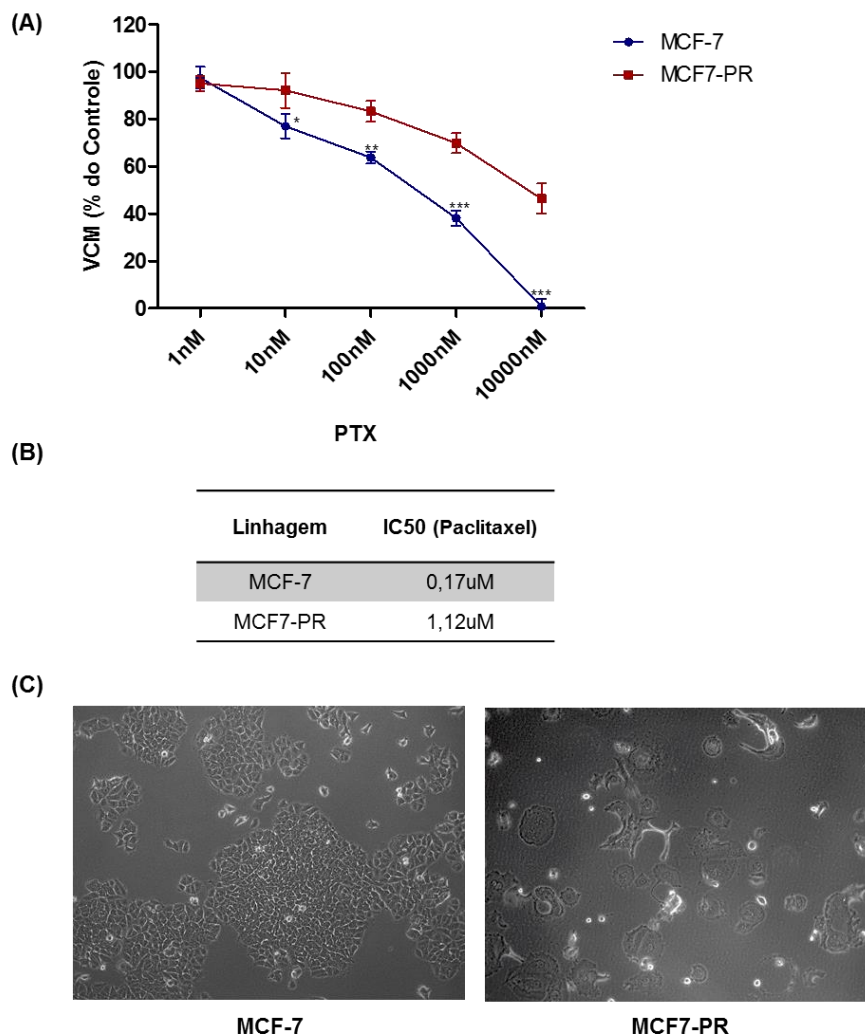


Figura 11 - Estabelecimento da linhagem resistente ao paclitaxel. (A) Análise da inibição da proliferação celular do PTX na linhagem de CAM luminal A MCF-7 e a variante gerada após exposição com PTX (MCF7-PR). As linhagens de CAM foram plaqueadas em placas de 96-poços e incubadas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. As células foram tratadas com PTX em concentrações que variavam de 1nM a 10uM por 48 horas. A proliferação celular foi mensurada através de ensaio de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste t de uma via não pareado foi realizado. \* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$  (B) Valores de IC<sub>50</sub> determinados após tratamento de 48h com PTX. (C) Microfotografias realizadas em microscópio ótico invertido em aumento de 10x evidenciando a alteração morfológica na variante gerada após exposição ao PTX (MCF7-PR)

#### **5.4 Caracterização das linhagens de CAM resistentes ao paclitaxel**

É consenso na literatura que linhagens celulares tumorais ao adquirirem resistência a um agente antineoplásico tornam-se também resistentes às drogas de mecanismo de ação similares (GUO et al., 2004; ZHENG, 2017). Adicionalmente, as células tumorais podem desenvolver resistência cruzada a compostos com estrutura química e mecanismo de ação distintos, fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR) (MARTIN et al., 2014; ZHENG, 2017). Isto posto, iniciamos as análises através do método de MTT com o objetivo de verificar a resistência cruzada da linhagem triplo-negativa resistente ao paclitaxel, MDA231-PR, frente aos tratamentos com quimioterápicos de importância clínica na terapia do CAM (doxorubicina, cisplatina e 5-fluoracil) (Figura 12).

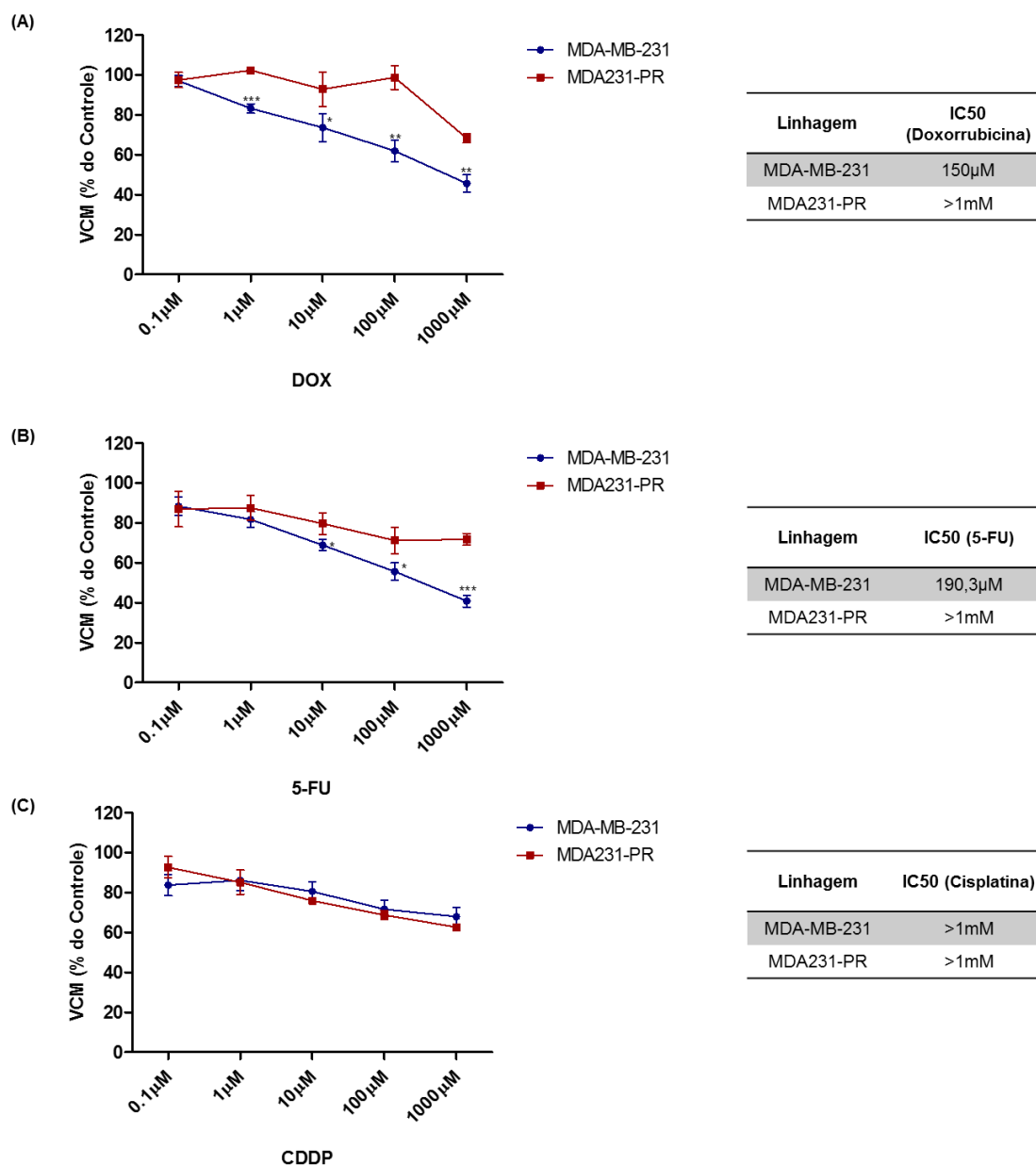


Figura 12 - Avaliação da resistência cruzada aos quimioterápicos 5-fluoracil, doxorrubicina e cisplatina na linhagem triplo-negativa resistente ao paclitaxel MDA231-PR. As linhagens de CAM foram plaqueadas em placas de 96-poços e incubadas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. As células foram tratadas com (A) DOX, (B) 5-FU e (C) CDDP em concentrações que variavam de 0,1µM a 1000uM por 48 horas. A proliferação celular foi mensurada através de ensaio de MTT após 48h de tratamento com os quimioterápicos. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste t de uma via não pareado foi realizado. \* indica P≤0,05; \*\*, P≤0,01; \*\*\*, P≤0,001

Podemos observar na figura 12 que a linhagem MDA231-PR apresentou resistência cruzada ao 5-fluorocil e doxorrubicina após tratamentos por 48 horas. Verificamos que a linhagem parental MDA-MB-231 foi mais sensível aos tratamentos com 5-fluorocil e doxorrubicina quando comparada à linhagem resistente ao paclitaxel (MDA231-PR). A linhagem parental MDA-MB-231 apresentou IC50 de 150µM para a doxorrubicina enquanto que a linhagem resistente MDA231-PR não atingiu valores de IC50 com as doses testadas (>1mM). O mesmo fenômeno foi observado quando realizamos o tratamento com 5-fluorocil (190µM para MDA-MB231 vs >1mM para MDA231-PR) (Figura 12).

Conforme mencionado anteriormente, evidências recentes sugerem que o tratamento com taxano anteriormente ao uso das antraciclinas melhora a eficácia e a toxicidade da quimioterapia (aumento em média de 5% na pCR) (BINES et al., 2014). Portanto, a resistência cruzada à doxorrubicina após exposições ao paclitaxel configura uma evidência alarmante no cenário dos tumores triplo-negativos. Hansen e colaboradores (2015) verificaram que linhagens de câncer de mama resistentes ao docetaxel (MCF7<sub>RES</sub> and MDA<sub>RES</sub>) apresentaram resistência cruzada à epirrubicina, mas somente a linhagem triplo-negativa foi resistente também a oxaplatina. No que diz respeito ao 5-fluorocil, esse antimetabólito tem sido recomendado para pacientes triplo-negativas com doença metastática em associação com taxanos e antraciclinas (O'SHAUGHNESSY et al., 2015; SHAO et al., 2016). Portanto a resistência cruzada pode trazer prejuízos ao tratamento dos tumores triplo-negativos.

Nota-se ainda, na figura 12, que a linhagem resistente ao taxano não mostrou-se mais resistente do que a linhagem parental quando tratada com cisplatina. As duas linhagens apresentaram IC50 maior do que a dose mais alta testada *in vitro*. Diversos estudos não observaram resistência cruzada à cisplatina ou derivados de platina em linhagens de câncer de mama resistentes aos taxanos (Li et al., 2013; HANSEN et al., 2015), entretanto Hansen e colaboradores (2015) observaram que a linhagem MDA-MB-231 resistente ao docetaxel apresentava resistência cruzada à oxaplatina. Cabe ressaltar que apesar da mesma classe de quimioterápicos utilizamos outros agentes no nosso estudo, o

que pode explicar ao menos parcialmente a diferença na sensibilidade da linhagem frente aos agentes citotóxicos.

Após estabelecer e confirmar a resistência ao paclitaxel utilizando o método de MTT nas variantes obtidas, seguimos com as análises com o propósito de caracterizar as alterações moleculares envolvidas na resistência ao taxano. Assim, conduzimos experimentos de expressão gênica e proteica, avaliação de morte celular e ensaios colorimétricos.

#### 5.4.1 Análise da senescência celular induzida pelo paclitaxel nas linhagens de CAM resistentes

Intrigados com as marcantes alterações morfológicas nas variantes geradas, realizamos teste de SA- $\beta$ -GAL. Em tecidos senescentes, o X-GAL é hidrolisado pela  $\beta$ -galactosidase produzindo um composto de coloração azul (DIMRI et al. 1995). Verificou-se, então, que as linhagens MDA231-PR e MCF7-PR exibiram marcação positiva para SA- $\beta$ -GAL. Cumpre salientar que nem todas as células com morfologia característica de células senescentes apresentaram marcação azul, evidenciando a heterogeneidade obtida após a exposição ao paclitaxel (Figura 14).

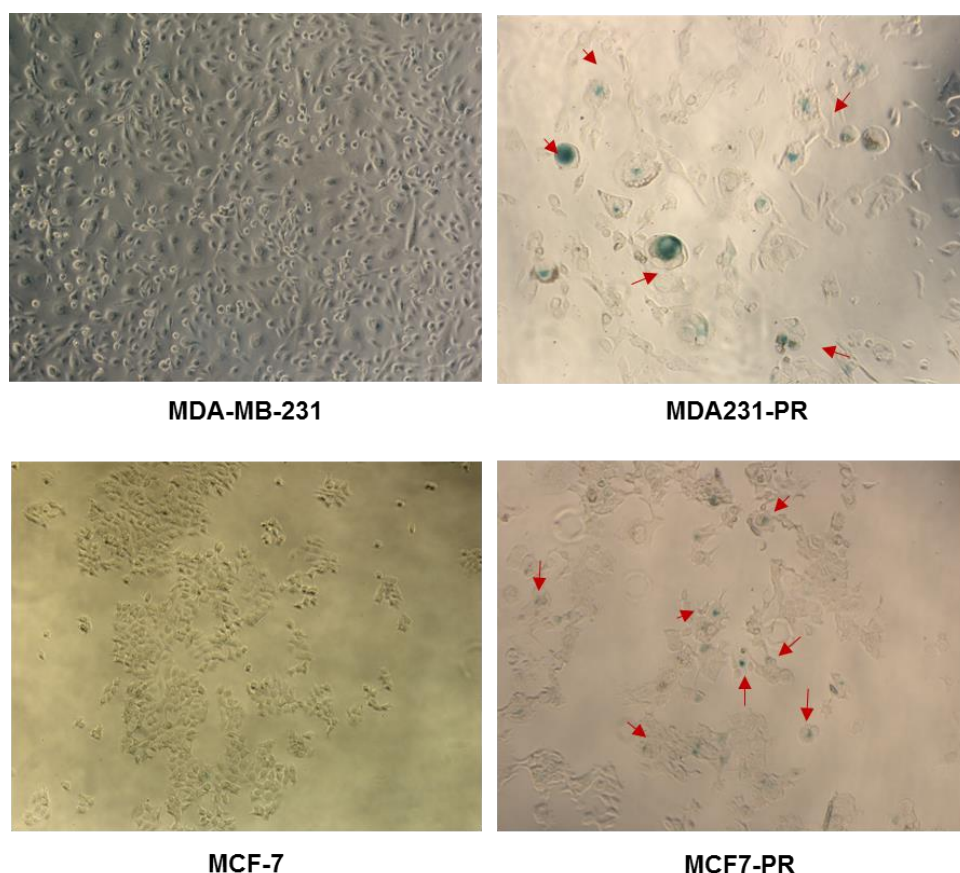


Figura 14 - As variantes resistentes ao paclitaxel (MDA231-PR e MCF7-PR) apresentaram marcação de SA-β-GAL. Microfotografias representativas de 3 experimentos independentes realizadas em microscópio ótico invertido em aumento de 10x (setas vermelhas indicam as células positivas para SA-β-GAL).

Desenvolvemos também modelo de resistência à doxorrubicina utilizando o mesmo procedimento experimental na resistência ao taxano. Utilizamos as mesmas linhagens parentais (MDA-MB-231 e MCF-7) e o modelo de tratamento intermitente que se assemelha aos ciclos de quimioterapia permitindo a recuperação em meio livre de droga após os choques com a antraciclina. Notamos que, ao realizarmos o teste de SA-β-GAL nas linhagens resistentes à doxorrubicina várias células apresentavam marcação positiva para a senescência (Figura 15). Assim, diferentes agentes antineoplásicos são capazes de induzir fenótipo senescente nos nossos modelos *in vitro*.



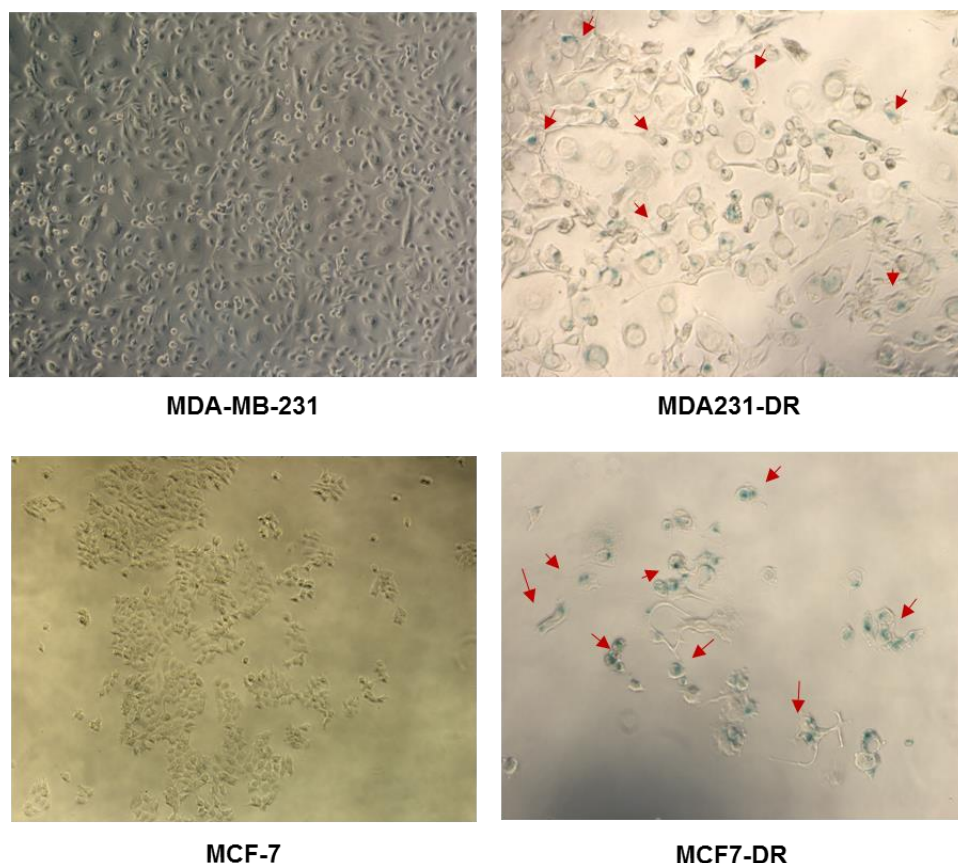


Figura 15 - As variantes resistentes à doxorubicina (MDA231-DR e MCF7-DR) apresentaram marcação de SA- $\beta$ -GAL. Microfotografias representativas de 3 experimentos independentes realizadas em microscópio ótico invertido em aumento de 10x (setas vermelhas indicam as células positivas para SA- $\beta$ -GAL).

Diversos estudos observaram a indução de senescência após tratamentos com doxorubicina em diferentes modelos biológicos (células tronco derivadas da medula óssea, células tronco derivadas do tecido adiposo e células tumorais de câncer de mama e cólon) (ELMORE et al., 2002; SANOFF et al., 2014; KOZHUKHAROVA et al., 2017; WAS et al., 2018). Destaca-se o estudo de Sanoff e colaboradores (2014) que observaram um aumento dos marcadores de senescência em células do sangue periférico de pacientes com câncer de mama tratados com regimes baseados em antraciclinas.

Posteriormente analisamos a expressão gênica dos inibidores da progressão do ciclo celular por qPCR nas linhagens de CAM MDA-MB-231/ MDA231-PR e MCF-7/ MCF7-PR com o intuito de verificar os possíveis efetores do fenótipo senescente observado nas variantes resistentes ao paclitaxel.

Os eventos do ciclo celular são controlados por uma rede de sinais moleculares, cujos componentes principais são as proteínas cinases dependentes de ciclina, ou apenas CDKs (Cyclin-Dependent Kinases). CDKs requerem uma ciclina para sua ativação e posterior fosforilação de proteínas-alvo adequadas envolvidas nos eventos do ciclo celular. Sem a ligação à ciclina apropriada as CDKs permanecem inativas. A atividade das CDKs pode ser inibida por outras proteínas, chamadas de inibidores de CDK (CKI), como p16<sup>INK4a</sup> (inibidor de CDK4/6) e membros da família CIP/KIP (p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>kip1</sup>) (bloqueiam múltiplos complexos ciclina-CDKs) (revisado por ASGHAR et al., 2015). p16<sup>INK4a</sup> inibe as atividades das CDK4 e CDK6, prevenindo a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), e consequente inativação, controlando assim a progressão das fases G1/S do ciclo celular (revisado por KIM & SHARPLESS, 2006). Os inibidores p21<sup>WAF1</sup> e p27<sup>kip1</sup>, por sua vez, são capazes de inibir todos os complexos de ciclina-CDKs configurando uma atividade mais ampla no controle do ciclo celular (STEIN et al., 1999). Vários estudos relacionaram a expressão dos inibidores de CDK e o desenvolvimento da senescência em diversos modelos *in vitro* e *in vivo* (revisado por CAMPISI, 2013; CHILDS et al., 2015; SHARPLESS & SHERR, 2015).

A expressão de p16<sup>INK4a</sup> aumenta em casos de dano tecidual ou estresse celular, pouco encontrado em tecidos jovens aumentando a sua expressão com o avanço da idade (ZINDY et al., 1997; KRISHNAMURTHY et al., 2004). Essa forte associação com a senescência faz com que p16<sup>INK4a</sup> configure como um dos principais marcadores e alvos de manipulação gênica associado aos processos de senescência celular. Em concordância com informações bem estabelecidas na literatura acerca do papel de p16<sup>INK4a</sup> na senescência celular, observamos na Figura 16 aumento estatisticamente significativo na expressão do RNAm de CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>) na linhagem MDA231-PR quando comparado à linhagem parental.

Cumpramos enfatizar que, além de p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1</sup> e p27<sup>kip1</sup> são reconhecidos como efetores fundamentais para a senescência celular (BRINGOLD & SERRANO, 2000) e o aumento da expressão desses inibidores também foi observado na linhagem MDA231-PR, embora os dados obtidos não sejam estatisticamente significantes (Figura 16). Observamos perfil distinto na

linhagem luminal resistente ao paclitaxel MCF7-PR com aumento estatisticamente significativo na expressão de CDKN1A (p21<sup>WAF1</sup>) e CDKN1B (p27<sup>kip1</sup>) quando comparado à linhagem parental MCF-7. Esse fenômeno pode ser explicado, ao menos parcialmente, pelas diferenças moleculares das duas linhagens de CAM. Enquanto a MDA-MB-231 apresenta mutação no gene supressor tumoral p53, a linhagem MCF-7 possui a forma selvagem do gene (NEVE et al., 2006). É importante salientar que apesar de vários indícios de que p53 participa do processo de senescência celular, a sua expressão não é necessária para a ocorrência do fenômeno, dependendo do tipo celular e do status da via de p16<sup>INK4A</sup>-pRB (BEAUSÉJOUR et al., 2003; revisado por DESCHÊNES-SIMARD et al., 2014).

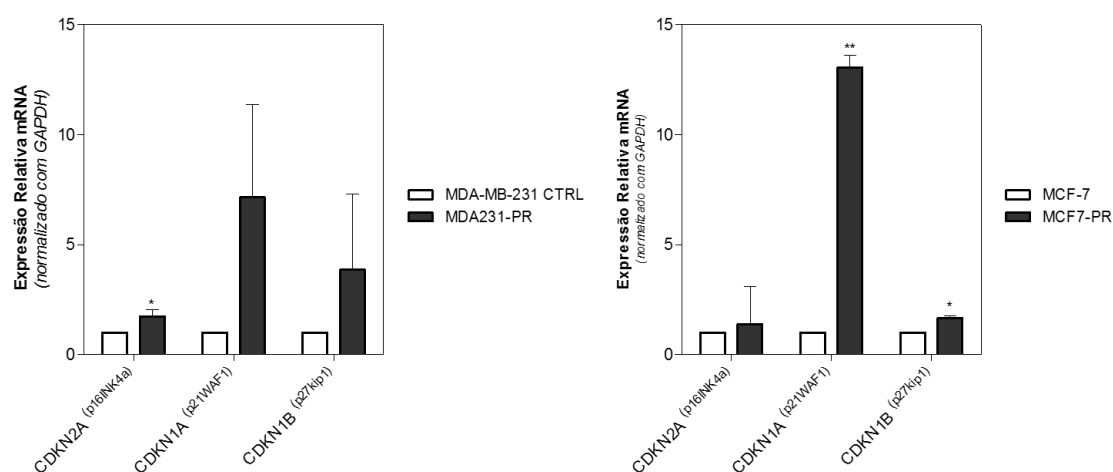


Figura 16 - Aumento de expressão dos inibidores de CDKs, CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>), CDKN1A (p21<sup>WAF1</sup>) e CDKN1B (p27<sup>kip1</sup>) nas linhagens resistente ao PTX (MDA231-PR e MCF7-PR). Análise da expressão de mRNA por qPCR nas linhagens de CAM MDA-MB-231 e MDA231-PR; MCF-7 e MCF7-PR empregando-se GAPDH como controle interno. Os experimentos foram realizados em triplicatas (n=3) e Teste *t* de uma via não pareado foi realizado. \* indica  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

Motivados pelos nossos resultados experimentais, prosseguimos com os estudos focando, a partir deste momento, na linhagem triplo negativa MDA-MB-231 e sua variante resistente ao paclitaxel MDA231-PR.

#### 5.4.2 Avaliação da expressão gênica e secreção de citocinas pró-inflamatórias na linhagem resistente MDA231-PR

O SASP é caracterizado por um complexo secretoma composto de citocinas pró-inflamatórias (membros da família IL-1, IL-6 e IL-8), fatores de crescimento (VEGF, fator de crescimento fibroblástico básico [bFGF] e fatores de crescimento relacionados à insulina 1 [IGFBP1]), além de proteases (metalloproteinasas e inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 [PAI-1]) (WANG et al., 1996; LIU & HORNSBY, 2007; COPPÉ et al., 2008; KUILMAN et al., 2008). Atualmente, sabe-se que as citocinas do SASP diferem entre os tipos celulares e a sua produção depende especialmente da via do NFκB e proteína cinases ativadas por mitógenos p38 (p38<sup>MAPK</sup>) (OHANNA et al., 2011; KANG et al., 2015; revisado por CAPECE et al., 2017), além de ser regulado pela via de mTOR (HERRANZ et al., 2015; LABERGE et al., 2015).

A fim de determinar o perfil de citocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas no SASP e, conseqüentemente, na resistência ao paclitaxel na linhagem MDA231-PR, realizamos experimentos de expressão gênica por qPCR e avaliamos a secreção das citocinas IL-6 e IL-1β no sobrenadante das linhagens de triplo negativa MDAMB231 e sua variante resistente MDA231-PR. Os resultados estão representados na Figura 17. Podemos observar que a variante resistente apresentou aumento na expressão de IL-6 em torno de 60 vezes quando comparada à linhagem parental ( $p \leq 0,01$ ). Consistente com esses dados, observamos aumento na secreção dessa citocina no sobrenadante da variante resistente (0,14ng/mL vs 1,62ng/mL) ( $p \leq 0,01$ ). Notamos ainda aumento estatisticamente significativo no mRNA de IL-8 (cerca de 52 vezes), IL-1α (cerca de 16 vezes) e IL-1β (cerca de 73 vezes) na MDA231-PR quando comparada à linhagem parental MDA-MB-231. Cumpre destacar que diferentemente do observado com a IL-6, não encontramos diferença na concentração de IL-1β no sobrenadante da variante resistente quando comparamos à linhagem parental (Figura 17B).

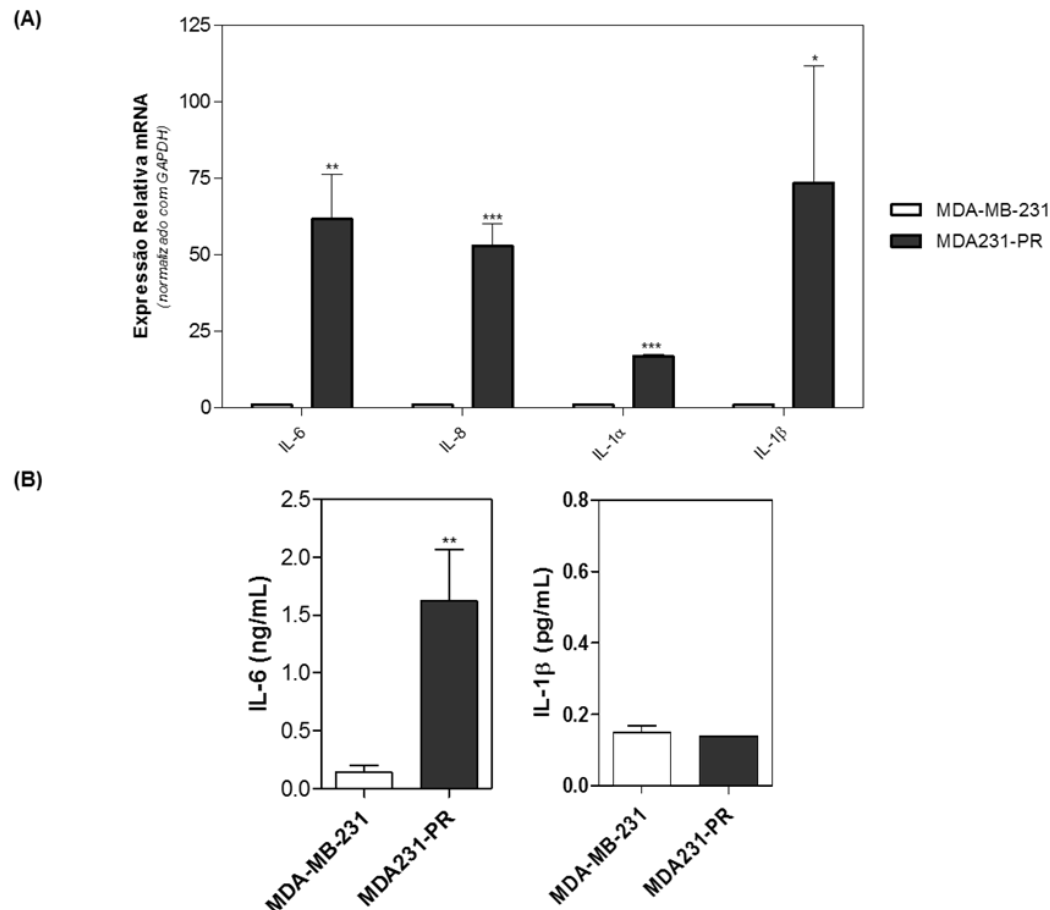


Figura 17 - Resistência ao PTX na linhagem triplo negativa MDA231-PR resulta em aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas com SASP. (A) Análise da expressão de mRNA por qPCR nas linhagens de CAM MDA-MB-231 e MDA231-PR empregando-se GAPDH como controle interno. (B) Secreção de IL-6 e IL-1 $\beta$  no sobrenadante das linhagens MDAMB-231 e MDA231-PR. Os experimentos foram realizados em triplicatas (n=3) e Teste *t* de uma via não pareado foi realizado. \* indica  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

Abundante nos tumores, IL-1 é uma das citocinas pró-inflamatórias mais potentes envolvidas na modulação do crescimento tumoral, invasividade e pior prognóstico da doença (REED et al., 2009; HOLEN et al., 2016). No CAM os níveis de IL-1 $\beta$  estão relacionados a tumores de pior estadiamento e com perfil mais agressivo (carcinomas invasivos) (JIN et al., 1997; ESPINOZA et al., 2016). IL-1 é uma família de citocinas composta por 11 membros dos quais os agonistas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) são os mais estudados (revisado por DINARELLO, 2009). Apesar de terem funções biológicas semelhantes, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  diferem na forma que são processadas e secretadas. IL-1 $\alpha$  está no citosol ou ligada à membrana atuando de forma

autócrina, em contraste IL-1 $\beta$  é sintetizada como uma proteína precursora de 31kDa e clivada pela caspase-1 (enzima envolvida no processo de apoptose) em sua forma ativa madura de 17kDa e posteriormente secretada (DINARELLO, 1996). A ativação da caspase-1 ocorre via recrutamento de um complexo multiproteico denominado de inflamassoma. Tanto IL-1 $\alpha$  quanto IL-1 $\beta$  iniciam uma cascata de sinalização que culmina na expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e mediadores secundários da inflamação dependentes da ativação dos fatores de transcrição NF $\kappa$ B e a proteína ativadora-1(AP-1) (revisado por WEBER; WASILIEW & KRACHT, 2010).

Intrigantemente, apesar do significativo aumento na expressão de IL-1 $\beta$  na variante resistente, não observamos aumento da proteína no sobrenadante dessas células (Figura 17). Esse fenômeno pode ser explicado, ao menos parcialmente, por meio dos mecanismos de processamento e secreção da IL-1 $\beta$ . Os mecanismos de secreção ainda não estão elucidados, mas potencialmente incluem a secreção por lisossomos, microvesículas e através da membrana plasmática (MACKENZIE et al., 2001; ANDREI et al., 2004; SHIRASAKI et al., 2014). Recentemente a autofagia vem ganhando destaque nos estudos de secreção de membros da família IL-1, especialmente IL-1 $\beta$ . Enquanto alguns estudos evidenciaram inibição da secreção e degradação da pró-IL-1 $\beta$  com o aumento da autofagia (SAITOH et al., 2008; HARRIS et al., 2011), estudos adicionais determinaram que o aumento da autofagia transiente reflete em aumento da secreção da forma madura de IL-1 $\beta$  (DUPONT et al., 2011; JIANG S. et al., 2013). Assim, para melhor elucidção desse fenômeno observado no presente trabalho, é necessário maior investigação acerca dos mecanismos de processamento e liberação da IL-1 $\beta$ .

Adicionalmente, as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 estão relacionadas com a manutenção e propagação do SASP no microambiente tumoral (COPPÉ et al., 2008; revisado por LASRY & BEN-NERIAH, 2015). Cumpre enfatizar que elevadas concentrações dessas citocinas já foram correlacionadas com TNBC (CHAVEY et al., 2007; HARTMAN et al., 2013).

IL-8 é produzida por uma enorme variedade de células em resposta a diferentes estímulos inflamatórios e estudos sugerem que a sua função no

câncer está relacionada à estimulação da invasão e metástase (HARTMAN et al., 2013; revisado por LASRY & BEN-NERIAH, 2015). Nossos achados são corroborados por Shao e colaboradores (2013) que observaram aumento da sensibilidade das células de CAM ao docetaxel após a depleção de IL-8, revelando o papel dessa citocina na resistência aos taxanos.

IL-6 é uma potente citocina pró-inflamatória que desempenha funções pleiotrópicas em vários tipos celulares. É produzida não só por células do sistema imunológico, mas também por células tumorais de mama e fibroblastos do estroma mamário (STUDEBAKER et al., 2008; SANGUINETTI et al., 2015). A IL-6, particularmente apresenta um papel complexo e dúbio no microambiente do câncer por desempenhar papel pró-tumoral bem como antitumoral. Diversas evidências apontam a participação da IL-6 em vias fundamentais para a tumorigênese e progressão tumoral, como inibição da apoptose, angiogênese, proliferação, sobrevivência, invasividade, metástases e metabolismo (WEGIEL et al., 2008; CHANG et al., 2013; LIANG et al., 2017). É importante salientar também a participação da IL-6 na quimiorresistência. Secreção autócrina de IL-6 em linhagens de CAM resultou em resistência aos quimioterápicos (fenótipo MDR) sem alterar, entretanto, a taxa de proliferação celular (CONZE et al., 2001).

Assim, nossos resultados permitem estabelecer uma associação entre a resistência ao paclitaxel e senescência celular na linhagem triplo-negativa MDA231-PR. Semelhantemente tratamento com paclitaxel também induziu senescência em modelos murinos (fibroblastos) evidenciado pela redução na taxa proliferativa, aumento da atividade de SA- $\beta$ -GAL, aumento de expressão de p16<sup>INK4a</sup> e de vários fatores característicos do SASP (IL-1 $\alpha$ , IL-6, MMP3) (DEMARIA et al., 2016).

#### 5.4.3 Avaliação do fenótipo de células-tronco tumorais (CSC) na linhagem resistente ao paclitaxel MDA231-PR

Após traçarmos o perfil de expressão e secreção das citocinas que compõe o SASP na linhagem MDA231-PR, investigamos a presença dos marcadores de

CSC, fator de transcrição Nanog (NANOG), antígeno de superfície epitelial (ESA) e as moléculas de adesão de superfície celular CD44 e CD24.

Recentemente, a quimiorresistência também vem sendo atribuída a sub-populações celulares da massa tumoral, denominadas CSC, às quais possuem resistência intrínseca à terapia e estariam envolvidas na iniciação, progressão e recidiva tumoral. Diversos marcadores que permitem a identificação de CSC vêm sendo propostos, sendo que esses geralmente correspondem a fatores de transcrição, proteínas de citoesqueleto e de membrana, cuja expressão está relacionada ao fenótipo indiferenciado das células (revisado por ALISON; LIM; NICHOLSON, 2011).

Ademais, a ativação de respostas pró-inflamatórias provocam mudanças significativas nas células, favorecendo a abertura da cromatina e aumento da plasticidade epigenética. Nesse sentido a IL-6 e IL-8 tem papel fundamental induzindo pluripotência nas células aumentando o estado de células tronco e formação de mamóferas (SANSONE et al., 2007; ILIOPOULOS et al., 2011; SINGH et al., 2013)

Com o propósito de testar a hipótese de que as citocinas IL-6 e IL-8 podem favorecer o aparecimento de marcadores de CSC e que tratamentos com paclitaxel promovem a manifestação desse fenótipo, realizamos experimentos de expressão gênica por qPCR na linhagem triplo negativa parental e na variante resistente ao paclitaxel. Podemos observar na Figura 18 um aumento significativo na expressão de mRNA dos marcadores de CSC na linhagem MDA231-PR quando comparada à linhagem parental (CD24 [ $p \leq 0,05$ ], CD44 [ $p \leq 0,01$ ] e NANOG [ $p \leq 0,05$ ]). Nota-se também, apesar de não ter significância estatística, verificamos aumento na expressão de ESA na variante resistente.



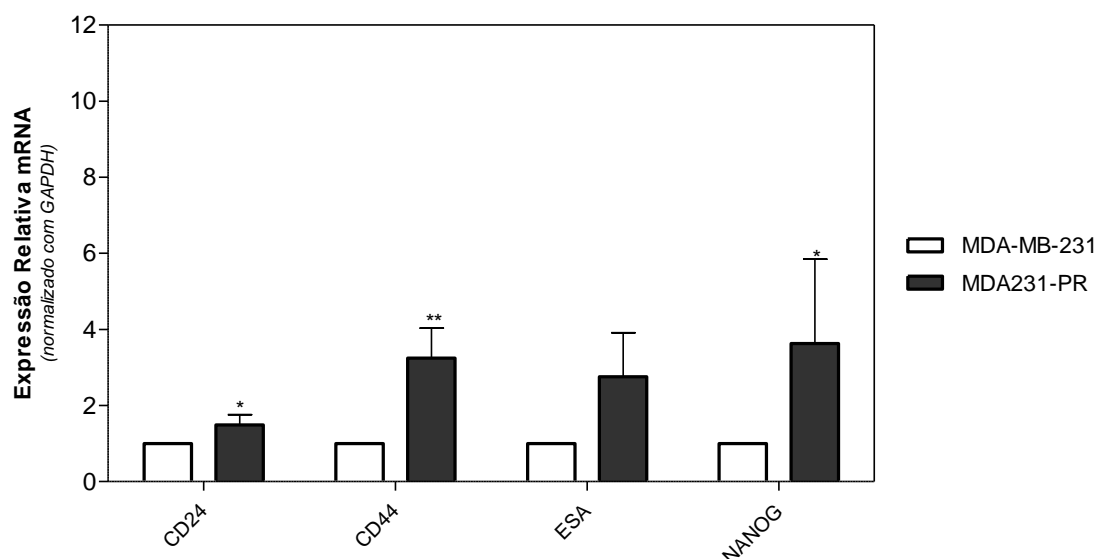


Figura 18 - Resistência ao PTX na linhagem triplo negativa MDA231-PR resulta em aumento dos marcadores de CSC. Análise da expressão de mRNA por qPCR nas linhagens de CAM MDA-MB-231 e MDA231-PR empregando-se GAPDH como controle interno. Os experimentos foram realizados em triplicatas (n=3) e Teste *t* de uma via não pareado foi realizado. \* indica  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

Inúmeros estudos clínicos tentaram caracterizar as células tronco tumorais nos tumores de mama e em indivíduos normais, entretanto não há um consenso entre os marcadores utilizados para caracterizar as CSC no CAM (denominadas de *breast cancer stem cells* – BCSC) (revisado por CARNERO et al., 2016). A avaliação de CD24 e CD44 configura os marcadores mais comuns na identificação de BCSC. Modelos *in vitro* relacionaram o aumento da população CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> como consequência de tratamentos com quimioterápicos, inclusive paclitaxel.

Nossos dados são corroborados por aqueles de FILLMORE & KUPERWASSER (2008) que conduziram experimentos em diversas linhagens de CAM e observaram que após tratamento com 10nM de paclitaxel por 6 dias as células sobreviventes eram enriquecidas com o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/ESA<sup>+</sup> (avaliado por citometria de fluxo). Interessantemente, após os tratamentos com o taxano apenas 1% das células da linhagem MDA-MB-231 sobreviveram, das quais 30% eram CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/ESA<sup>+</sup>. Adicionalmente, células MDA-MB-231 tratadas agudamente com 25nM de docetaxel por 24h não apresentaram

alteração na viabilidade celular, entretanto observou-se aumento de populações celulares com o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (GOLDMAN et al., 2015). Cumpre ressaltar ainda que estudos com tumores de mama observaram forte correlação entre a expressão de NANOG e pior prognóstico da doença e doença metastática (NAGATA et al., 2014; NAGATA et al., 2017).

Análises de expressão gênica em tumores de mama revelaram que o perfil CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> está associado a altos níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além de genes relacionados à diferenciação, transporte de proteínas e proliferação (BERTUCCI; CERVERA & BIRNBAUM, 2007; LIU et al., 2007).

Locais com inflamação transiente, a resposta mediada por IL-6 (via ativação de NF $\kappa$ B) pode ser acompanhada por regeneração tecidual ou reparação com transdiferenciação (quando, por exemplo, fibroblastos são reprogramado à células endoteliais para aumentar a densidade microvascular em resposta à injúria isquêmica pós infarto agudo no miocárdio) (COOKE et al., 2015; CHICHE et al., 2017). Entretanto, em locais com inflamação crônica observa-se reprogramação das células e reparo tecidual acompanhado do aparecimento de células com fenótipo *cancer-like* (KUILMAN et al., 2008). Interessantemente, os tumores que não tem origem inflamatória podem desenvolver um microambiente rico em citocinas pró-inflamatórias, que dão suporte ao crescimento tumoral e metástase. IL-6 desempenha papel central na conversão de células que não apresentam características de células tronco em células CSC-like, contribuindo para a heterogeneidade tumoral e quimiorresistência (ILIOPOULOS et al., 2011; KORKAYA et al., 2012; KRISHNAMURTHY et al., 2014)

Adicionalmente, diversos estudos reportaram que células tumorais senescentes podem exibir algumas características de CSC (ERENPREISA & CRAGG, 2013; GERASHCHENKO et al., 2016). Was e colaboradores (2018) observaram um aumento na expressão de NANOG em células de câncer de cólon senescentes induzidas por quimioterapia (5-fluorouracil, irinotecan e doxorrubicina). Observaram ainda que a subpopulação senescente apresenta um fenótipo específico compreendendo características de células tronco e células diferenciadas. Importaneamente, Gerashchenko e colaboradores (2016)

verificaram que células de câncer de mama não responsivas à quimioterapia neoadjuvante e com poliploidia (característica associada à senescência) apresentavam alta expressão de NANOG e p16<sup>INK4a</sup>.

Assim, nossos dados evidenciam um enriquecimento do fenótipo CSC na linhagem resistente ao paclitaxel MDA231-PR possivelmente induzido pelas citocinas que compõe o SASP, IL-6 e IL-8, produzidas pelas células senescentes. É importante frisar que estudos de expressão proteica deverão ser conduzidos para confirmar os achados de expressão gênica em relação aos marcadores de CSC.

#### 5.4.4 Avaliação da expressão gênica de P70S6K na linhagem resistente ao paclitaxel MDA231-PR

Posteriormente, realizamos experimentos de expressão gênica por qPCR na linhagem triplo negativa parental e na variante resistente ao paclitaxel objetivando avaliar a via de mTOR/p70S6K (Figura 19).

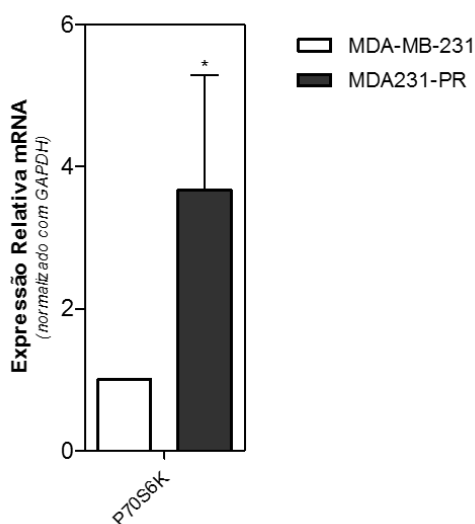


Figura 19 - Resistência ao PTX na linhagem triplo negativa MDA231-PR resulta em aumento da expressão de p70S6K. Análise da expressão de mRNA por qPCR nas linhagens de CAM MDA-MB-231 e MDA231-PR empregando-se GAPDH como controle interno. Os experimentos foram realizados em triplicatas (n=3) e Teste *t* de uma via não pareado foi realizado. \* indica  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

Podemos observar na figura 19 um aumento estatisticamente significativo na expressão de mRNA de P70S6K na linhagem MDA231-PR quando comparada com a linhagem parental, MDA-MB-231. mTOR é uma serina/treonina cinase, que pertence à via de sinalização PI3K/AKT e desempenha um papel central como regulador da sobrevivência, crescimento celular, proliferação e motilidade (MURUGAN; ALZAHRANI; XING, 2013; LIU et al., 2017). Uma vez ativado, mTOR promove suas ações principais por fosforilação de seus efetores p70S6K e 4EBP-1, proteínas envolvidas na tradução de mRNA e regulação da síntese proteica (GUERTIN & SABATINI, 2007).

Interessantemente vários estudos observaram que mTOR regula positivamente a senescência em diferentes modelos biológicos (DEMIDENKO et al., 2009; BLAGOSKLONNY et al., 2012; GARBERS et al., 2013). Narita e colaboradores (2011) demonstraram que a sublocalização celular de mTOR e autofagia participam de processos anabólicos e catabólicos durante a senescência e, apesar de mTOR inibir o início da cascata autofágica, os estágios finais da autofagia (autolisossomo) facilitam a ativação de mTOR. Adicionalmente a ligação de mTOR com o autolisossomo facilita a síntese proteica de IL-6 e IL-8 em modelos de OIS (NARITA et al., 2011).

#### 5.4.5 Investigação da via de MAPK, GSK3 $\beta$ , mTOR/S6K, apoptose e autofagia na resistência ao paclitaxel no TNBC

Com o intuito de compreendermos melhor as vias celulares envolvidas na resistência ao paclitaxel, realizamos análises de expressão proteica da proteína cinase ERK1/2, glicogênio sintase 3 cinase  $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), p70S6K, proteína pró-apoptótica Bax e proteínas envolvidas com o processo de autofagia (LC3B e Beclina-1) através da técnica de Western Blot, utilizando o GAPDH como controle de carregamento em cada experimento (Figura 21 e 21).

Conforme mostrado na Figura 20, nossos resultados experimentais são sugestivos de aumento da ativação de ERK1/2 ao compararmos a linhagem resistente MDA231-PR com a linhagem parental. Notamos, ainda, diminuição na fosforilação de GSK-3 $\beta$  na linhagem MDA231-PR. E verificamos aumento na fosforilação de p70S6K na linhagem resistente ao taxano MDA231-PR quando comparamos com a linhagem parental MDA-MB-231.

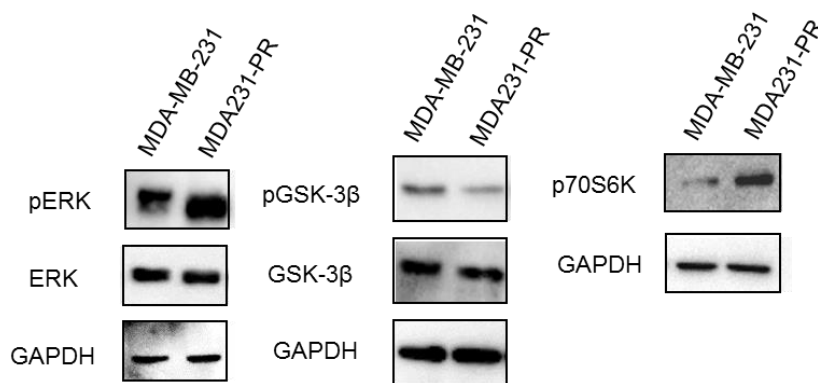


Figura 20 - Análise da expressão de ERK, GSK-3 $\beta$  e p70S6K<sup>T421/S424</sup> nas linhagens MDA-MB231 e MDA231-PR. Figura representativa de 3 experimentos independentes (n=3). GAPDH foi utilizado como controle interno de carregamento.

A marcada ativação na via de ERK1/2 retratada na linhagem MDA231-PR pode ser explicada, ao menos parcialmente, pela ativação da via por meio das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8. Conforme observamos na Figura 16, a linhagem resistente ao paclitaxel apresentou significativo aumento de IL-6 no sobrenadante, e dados na literatura mostram que IL-6 pode ativar ERK1/2 em mamosferas obtidas de tumores mamários agressivos (SANGUINETTI et al., 2015). Adicionalmente Che e colaboradores (2014) observaram que IL-6 promove proliferação nas células de câncer de endométrio por meio de um mecanismo de retroalimentação positiva envolvendo a via de ERK1/1 e NF $\kappa$ B. Por sua vez, KIM e colaboradores (2016) constataram que a expressão de IL-8 em linhagens TNBC é dependente da ativação da via de ERK1/2. Cumpre enfatizar ainda que IL-8 é capaz de aumentar a fosforilação de ERK1/2 e AKT em modelo de câncer de cólon (JIANG et al., 2017).

A ativação de p70S6K observada nos experimentos de expressão proteica (Figura 20) corroboram com os nossos resultados de expressão gênica (Figura 19). Assim, podemos determinar que a linhagem resistente ao paclitaxel possui um aumento na expressão e ativação da via de mTOR/p70S6K relacionada com diferentes processos tumorais importantes como senescência, quimiorresistência, proliferação e evasão.

GSK-3 $\beta$  é uma serina/treonina cinase com papel dual no câncer, dispondo de características pro-oncogenicas e antitumorais. A atividade completa de GSK-

3 $\beta$  geralmente requer a fosforilação no resíduo 216, e inversamente, a fosforilação no resíduo de Serina 9 (Ser<sup>9</sup>) inativa a enzima por meio da degradação nos proteassomas (FANG et al., 2000; SUTHERLAND; LEIGHTON & COHEN, 1993). Estudos previos evidenciaram que Akt e PKA são capazes de inativar GSK-3 $\beta$  ao fosforilar Ser<sup>9</sup> (FANG et al., 2000). Ademais ERK é capaz de fosforilar GSK-3 $\beta$  no resíduo de treonina 43 (thr<sup>43</sup>) levando a subsequente fosforilação por p90RSK (efetor da via de Akt/mTOR) (DING et al., 2005).

A proteína GSK-3 $\beta$  age como inibidora chave na via de sinalização canônica de Wnt/ $\beta$ -catenina. A  $\beta$ -catenina, na ausência de sinal de Wnt, é fosforilada no citoplasma por GSK-3 $\beta$  culminando na sua degradação em um proteassoma (revisado por LOGAN & NUSSE, 2004). Quando GSK-3 $\beta$  é fosforilado em Ser<sup>9</sup>, há um acúmulo de  $\beta$ -catenina que ao se deslocar para o núcleo ativa a expressão de uma variedade de genes relacionados com proliferação, diferenciação, migração e manutenção de pluripotência nas células adultas. A via de Wnt está correlacionada à formação de mamíferos e com propriedades de CSC no CAM (CHRISTENSEN et al., 2017).

Adicionalmente, a via de Wnt/ $\beta$ -catenina modula respostas inflamatórias e imunológicas por meio da interação com NF $\kappa$ B, que reciprocamente influencia a via de Wnt/ $\beta$ -catenina (BUSS et al., 2004). Diante do exposto, o aumento da fosforilação de GSK-3 $\beta$  em Ser<sup>9</sup> na linhagem resistente ao paclitaxel (Figura 20) pode estar relacionada a diversos fatores abordados previamente, a saber: i) ativação da via de PKA ou Akt (via IL-8); ii) ativação da via de NF $\kappa$ B por meio das citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 $\beta$ , iii) indução do fenótipo de CSC modulado por IL-6 e IL-8 perpassando pela ativação da via de Wnt/ $\beta$ -catenina, iv) ativação da via de ERK e subsequente inativação de GSK-3 $\beta$ .

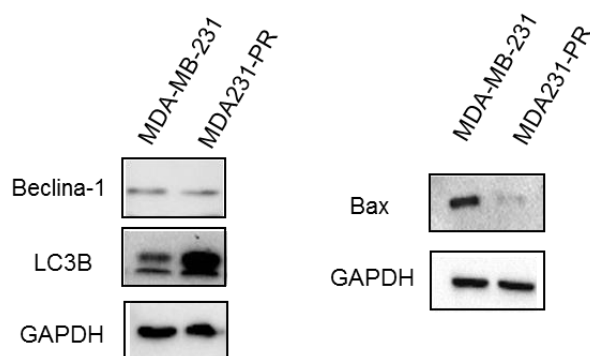


Figura 21 - Análise da expressão de Beclina-1, LC3B e Bax nas linhagens MDA-MB231 e MDA231-PR. Figura representativa de 3 experimentos independentes (n=3). GAPDH foi utilizado como controle interno de carregamento.

A autofagia tem papel central no controle de qualidade das macromoléculas e homeostase energética. Outrossim, a autofagia pode ser induzida em resposta à vários estresses celulares, mediando os efeitos citotóxicos e antiproliferativos frente ao tratamento com diversos quimioterápicos (WEN et al., 2015; CHEN & SHI, 2016).

O início da autofagia depende da formação do autofagossoma. Para o fim, ativa-se a maquinaria autofágica, primordialmente constituída de proteínas essenciais da autofagia ou Atgs. Dentre elas, Atg6, também chamada de beclina-1, é importante para a formação do autofagossoma especificamente por meio de sua complexação com PI3K classe III (WANG et al., 2009). LC3 é a única proteína Atg que se encontra em células eucariontes associada ao autofagossoma maduro, existindo em duas formas, a LC3-I (citossol) e a sua derivada proteolítica LC3-II (membrana do fagóforo). A quantificação da LC3-II é normalmente utilizada para estimar a abundância de autofagossomas. Após a fusão do autofagossoma com o lisossoma, esta proteína é degradada (GLICK; BARTH & MACLEOD, 2010)

Como pode ser verificado por meio dos dados expostos na Figura 21, a linhagem resistente ao taxano apresentou maior expressão de LC3BI e LC3BII quando comparada à linhagem parental. Nota-se ainda que a expressão de Beclina-1 não foi alterada, assim, podemos assumir que possivelmente no momento da observação do fenômeno a maioria dos autofagossomas estariam na sua forma madura (Figura 21). Outras análises deverão ser realizadas para

caracterizar melhor o papel da autofagia na resistencia ao taxano no nosso modelo. Cumpre salientar que, corroborando com nossos achados, Wen e colaboradores (2015) observaram aumento da atividade basal da autofagia (aumento da expressão de LC3B II) conferindo citoproteção em decorrência ao tratamento com paclitaxel em linhagem MDA-MB-231 resistente ao quimioterápico. Ainda, demonstrou que a inibição da autofagia recupera a sensibilidade ao taxano na linhagem resistente.

Nos últimos anos vem crescendo as evidências da associação entre a senescência (SEN-REP; DDIS e OIS) e a autofagia em vários modelos biológicos distintos (YOUNG et al., 2009; SASAKI et al., 2010; NARITA et al., 2011; CAPPARELLI et al., 2012; HERRANZ et al., 2015; LABERGE et al., 2015). A inibição da autofagia suprime a produção de IL-6 e IL-8 e atrasa o estabelecimento da senescência (SASAKI et al., 2010). É importante enfatizar que a inibição da autofagia apenas atrasa mas não impede o aparecimento do fenótipo senescente em modelos de OIS, sugerindo um papel na aceleração do processo senescente (YOUNG et al., 2009). Em modelos de indução de senescência por quimioterápicos (doxorrubicina e camptotecina) em linhagens de CAM e cancer de colon, observou-se que a autofagia e senescência ocorrem em paralelo, mas não são fenômenos interdependentes (GOEHE et al., 2012).

Conforme observamos na Figura 21, a linhagem resistente ao paclitaxel apresentou significativa diminuição da proteína pro-apoptótica Bax. Bax pertence à família Bcl-2 composta de proteínas indutoras e repressoras da apoptose. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Inversamente, Bax, Bak e Bid são proteínas pró-apoptóticas (CZABOTAR et al., 2014).

As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou anti-apoptótico na célula. Na presença de um sinal apoptótico, Bax é translocada do citoplasma para as proximidades das mitocôndrias, onde sofre ativação e



modificação conformacional, aderindo à membrana mitocondrial externa. Essa integração possibilita a rápida liberação do citocromo c(3) e consequente ativação da apoptose (LIU et al., 2016).

Nossos resultados de expressão proteica de Bax são corroborados com outros estudos que associaram a diminuição de proteínas pró-apoptóticas e o aumento de proteínas anti-apoptóticas com a resistência aos taxanos em linhagens de câncer de mama (AJABNOOR et al., 2012; SHARIFI et al., 2014). Portanto, no nosso modelo de TNBC resistente ao paclitaxel (MDA231-PR) verificamos que a diminuição da expressão da proteína pró-apoptótica Bax pode explicar a falta de sensibilidade frente aos tratamentos com o taxano e às outras drogas testadas (doxorrubicina e 5-fluorouracil) (Figura 10 e Figura 12).

Avaliações complementares são necessárias para o completo esclarecimento acerca da relação entre apoptose, autofagia e senescência, principalmente no que concerne à secreção de fatores que aceleram o crescimento tumoral, induzem metástase e quimiorresistência.

### **5.3 Avaliação da metformina no regime terapêutico do TNBC resistente ao paclitaxel**

Motivados pelos resultados dos experimentos que avaliaram o efeito dos esquemas combinatórios envolvendo metformina e paclitaxel nas linhagens TNBC, e instigados pelas análises realizadas acerca da caracterização da resistência em nosso modelo, investigamos a utilização da metformina na reversão/modulação da resistência ao paclitaxel na linhagem MDA231-PR.

5.3.1 Investigação dos efeitos da metformina na indução de senescência provocado pelo paclitaxel nas linhagens triplo negativas.

Evidências recentes apontam o potencial terapêutico da metformina em diversas doenças relacionadas ao envelhecimento, em modelos animais e humanos, incluindo resistência à insulina, diabetes, disfunções metabólicas, doenças cardiovasculares e função cognitiva (revisado por HUFFMAN et al., 2016). Ademais a utilização da metformina pode aumentar em até 5 anos a

sobrevida de pacientes com diabetes comparados aos indivíduos não-diabéticos (BANNISTER et al., 2014). Diante disso, avaliamos o tratamento com metformina em dose clinicamente relevante no processo de indução de senescência provocado pelo paclitaxel.

Para tanto, realizamos o ensaio de SA- $\beta$ -GAL nas linhagens triplo negativas MDA-MB-231 e MDA231-PR. Realizamos esse experimento em conjunto com o estabelecimento da resistência na linhagem MDA-MB-231. Adicionamos metformina 10uM aos tratamentos crescentes de paclitaxel, conforme discutido na seção Materiais e Métodos. Utilizamos a linhagem MDA-MB-231 tratada com metformina nas mesmas condições como controle experimental. Conforme mostrado na Figura 22, nossos resultados experimentais revelam que o cotratamento com metformina na indução da resistência ao paclitaxel não alterou a morfologia (aumento no volume celular, morfologia “achatada” com múltiplos vacúolos e extensa pseudopodia), nem a marcação de SA- $\beta$ -GAL na linhagem MDA231-PR. Cumpre observar ainda, que os tratamentos por 48h com 10uM de metformina não foram capazes de produzir alterações morfológicas e induzir senescência na linhagem parental MDA-MB-231.

Han e colaboradores (2016) observaram que metformina (10mM) previne o desenvolvimento da senescência associada ao estresse oxidativo em fibroblastos humanos, via ativação de AMPK e inibição de autofagia. Não há estudos correlacionando o papel da metformina na prevenção da senescência induzida por quimioterápicos (TIS). É necessário novas abordagens experimentais para estabelecer a dose e o tempo de tratamento com metformina, além da realização das outras réplicas biológicas.

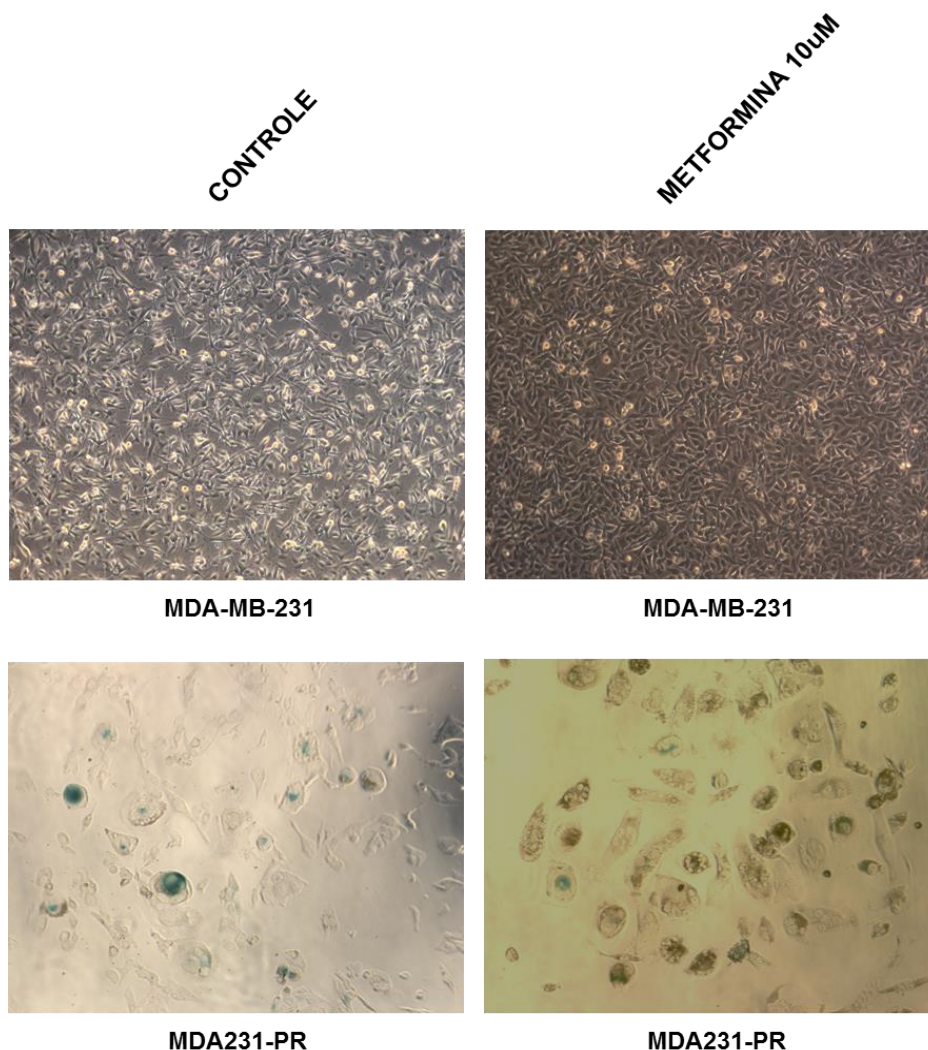


Figura 22 – Tratamento com MET não impediu o aparecimento do fenótipo senescente na linhagem de CAM resistente ao PTX (MDA231-PR). Microfotografias representativas de 1 experimento realizada em microscópio ótico invertido em aumento de 10x.

### 5.3.1 Análise da morte celular por citometria de fluxo

Em seguida, nos questionamos se a metformina seria capaz de ressensibilizar a linhagem parental ao taxano após receber o meio condicionado da linhagem resistente, por meio do ensaio de anexina V/PI. Utilizamos três condições experimentais distintas: meio fresco, meio condicionado (60:40) da linhagem parental (MDA-MB-231) e meio condicionado (60:40) da linhagem resistente MDA231-PR. Cabe ressaltar que o meio condicionado utilizado foi o mesmo das análises de ELISA conforme descrito na seção de Materiais e Métodos.

A anexina V faz parte de uma família de proteínas que possuem capacidade de se ligar a fosfolipídios da membrana plasmática, em um processo dependente de cálcio. Durante a apoptose ocorrem várias alterações celulares dentre elas a perda da simetria da membrana plasmática, resultando na exposição de fosfatidilserina (FS) na face externa da membrana celular. A anexina V não é capaz de penetrar na membrana plasmática de células viáveis, havendo a marcação apenas naquelas que apresentarem exposição da FS. E para diferenciar células vivas, em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose utilizou-se um intercalante de DNA, PI. Desta forma, células vivas não serão marcadas nem por anexina V nem por PI; células em apoptose inicial apresentam marcação positiva para anexina V e negativa para PI; células em apoptose tardia são positivas tanto para anexina V quanto para PI; e células em necrose apresentam marcação positiva somente para PI (revisado por VERMES et al., 1995). A fim de facilitar o entendimento do processo compilamos os gráficos em células viáveis x células em apoptose (Figura 23).

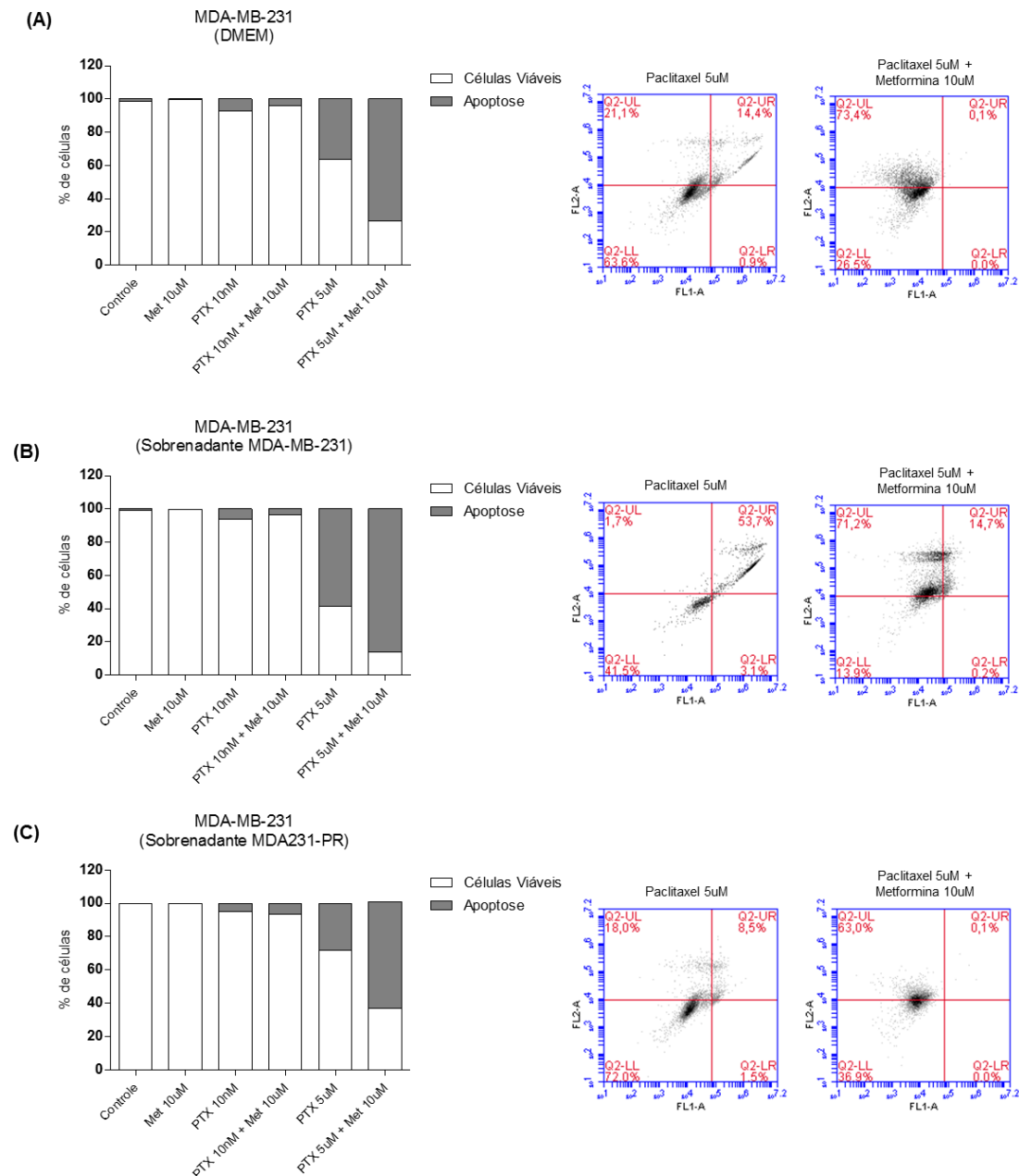


Figura 23 - Efeito do meio condicionado da linhagem MDA231-PR na indução de apoptose frente ao tratamento com paclitaxel e a re-sensibilização após cotratamento com metformina na linhagem parental MDA-MB-231. (A) Ensaio de anexina V/PI em resposta aos tratamentos com metformina e paclitaxel em monoterapia e em combinação utilizando meio fresco na linhagem MDA-MB-231. (B) Ensaio utilizando meio condicionado da linhagem MDA-MB-321 na linhagem MDA-MB-231. (C) Ensaio utilizando meio condicionado da linhagem MDA231-PR na linhagem MDA-MB-231. Figuras representativas de 1 experimento biológico.

Conforme apresentado na figura 16, o meio condicionado com sobrenadante da linhagem MDA231-PR conferiu resistência ao taxano na linhagem parental quando tratamos com 5uM de paclitaxel por 48h (Figura 23C). Esse resultado pode ser explicado pelo notório aumento na secreção de IL-6 observada no sobrenadante da linhagem resistente (Figura 17B). Observamos ainda que não houve mudanças marcantes quando utilizamos doses nanomolares de paclitaxel nas três condições experimentais, confirmando os resultados encontrados nas análises de proliferação celular (Figura 7). Tratamento com 10uM de metformina não induziu apoptose em nenhuma condição experimental testada, corroborando com o efeito evidenciado nos ensaios de MTT (Figura 6).

Podemos observar que os regimes combinados entre o paclitaxel e a metformina, em doses clinicamente relevantes, resultou em acentuado aumento na porcentagem de células em apoptose quando comparada ao tratamento com 5uM de paclitaxel em monoterapia em todas as condições experimentais analisadas. Esses dados corroboram com os resultados obtidos nas análises da proliferação celular nas linhagens de CAM (Figura 7). Ainda, observamos que esse efeito é dose dependente pois o mesmo fenômeno não foi observado com doses inferiores do taxano (10nM). Para melhor elucidação dos resultados, será necessário realizar mais réplicas biológicas do experimento.

### 5.3.2 Análise da modulação da expressão das citocinas pró-inflamatórias envolvidas com SASP frente ao tratamento combinado de metformina e paclitaxel.

Com o intuito de compreendermos melhor o papel da metformina na re-sensibilização das linhagens ao taxano, realizamos análises de expressão gênica nas linhagens MDA-MB-231 e MDA231-PR.

Observamos, na figura 24, que a adição da metformina ao tratamento com 5uM de paclitaxel diminuiu de forma estatisticamente significativa a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e IL-1 $\alpha$  ( $P \leq 0,001$ ) na linhagem MDA-MB-231 quando comparada ao tratamento com o taxano em monoterapia. A expressão de IL-1 $\beta$ , apesar de não ter significância estatística, também foi

modulada com a adição da metformina. Esse fenômeno não foi observado quando utilizamos doses nanomolares de paclitaxel. O tratamento com metformina em monoterapia não alterou a expressão das citocinas analisadas (comparada com a condição controle), com exceção de 1L-1 $\beta$ , que apresentou um leve aumento nos níveis de mRNA.

Intrigantemente observamos fenômenos completamente distintos quando analisamos os resultados obtidos na linhagem MDA231-PR. O tratamento combinado com metformina 10uM e paclitaxel diminuiu, de forma estatisticamente significativa, a expressão de IL-6 quando utilizamos doses menores do taxano (10nM). Notamos ainda que doses nanomolares do taxano foram capazes de aumentar a expressão das citocinas analisadas obtendo níveis parecidos ou marcadamente maiores de expressão quando comparado com doses micromolares do taxano (5uM) (Figura 25). O tratamento com 10uM de metformina por 48h na linhagem resistente ao paclitaxel diminuiu a expressão de todas as citocinas analisadas, apesar de não ter significância estatística (Figura 25).

Moiseeva e colaboradores (2013) observaram que tratamento com metformina inibiu a expressão de várias citocinas inflamatórias relacionadas com SASP por meio da interferência na via de NF $\kappa$ B, independente da ativação de AMPK. Adicionalmente, ao tratar células de câncer de próstata com o meio condicionado dos fibroblastos senescentes, notou-se aumento na taxa de proliferação. Interessantemente, ao adicionar metformina no meio condicionado o efeito proliferativo nas células foi inibido. Cumpre salientar que esse estudo utilizou doses milimolares de metformina em modelo de OIS em fibroblastos humanos.

É necessária a conclusão dos nossos estudos, analisando a expressão proteica das citocinas que compõem o SASP e entendermos melhor a modulação da metformina e do próprio paclitaxel na linhagem resistente.

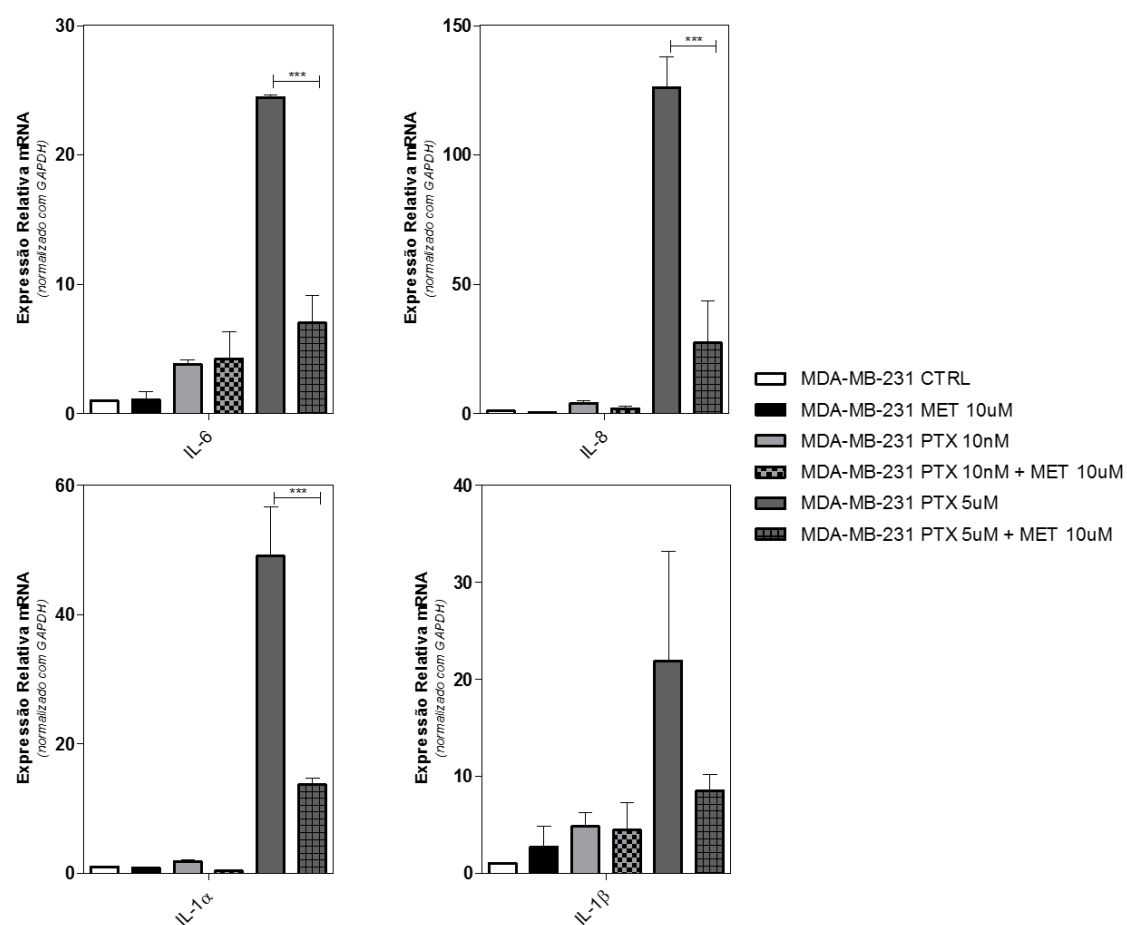


Figura 24 - Adição de MET ao tratamento com PTX modula a expressão das citocinas pró-inflamatórias envolvidas com SASP. (A) Análise da expressão de mRNA por qPCR nas linhagens de CAM MDA-MB-231 empregando-se GAPDH como controle interno. Os experimentos foram realizados em triplicatas (n=3) e Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. \* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$ .



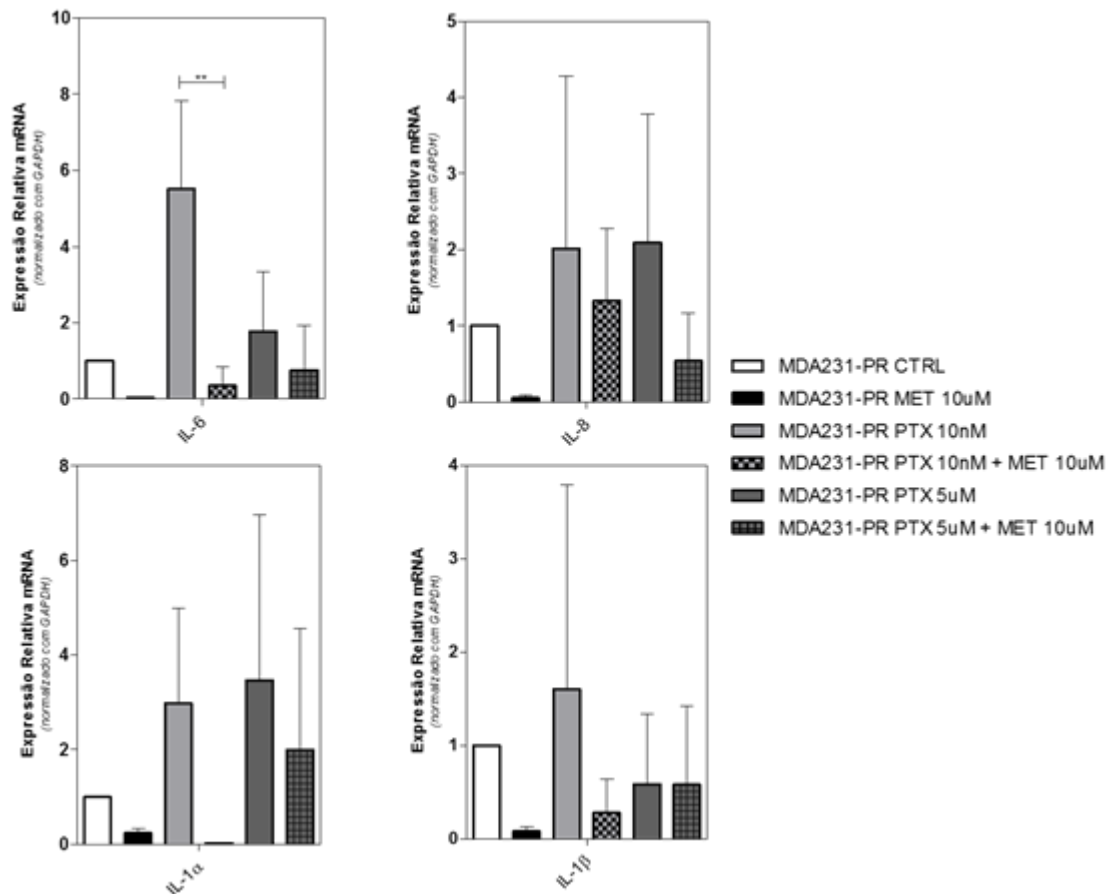


Figura 25 - Adição de MET ao tratamento com PTX modula a expressão das citocinas pró-inflamatórias envolvidas com SASP. (A) Análise da expressão de mRNA por qPCR nas linhagens de CAM MDA231-PR empregando-se GAPDH como controle interno. Os experimentos foram realizados em triplicatas (n=3) e Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. \* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$

### 5.3.3 Análise da modulação da expressão de P70S6K frente ao tratamento combinado de metformina e paclitaxel.

Motivados pelos resultados de expressão gênica e proteica acerca da via de mTOR/p70S6K (Figura 19 e Figura 20) realizamos experimentos de expressão gênica nas linhagens parental e resistente (MDA-MB-231 e MDA231-PR) com o objetivo de elucidar o papel da metformina nessa importante via celular.

Conforme apresentado na figura 24 o tratamento com metformina 10  $\mu$ M diminuiu a expressão gênica de P70S6K somente na linhagem parental, MDA-MB-231. E o co-tratamento com metformina e paclitaxel 5  $\mu$ M reverteu de maneira significativa a expressão gênica de p70S6K na linhagem parental ( $P \leq 0,001$ ). O mesmo fenômeno foi observado na linhagem resistente ao

paclitaxel, MDA231-PR, na qual o cotratamento com metformina nas duas doses testadas de paclitaxel reverteu o aumento de expressão causado pelo taxano, entretanto apenas na combinação com dose maior de paclitaxel a reversão foi estatisticamente significativa ( $P \leq 0,001$ ) (Figura 26). É preciso realizar os estudos de expressão proteica para elucidarmos o papel da metformina na modulação da via de mTOR/p70S6K na resistência ao paclitaxel e no SASP.

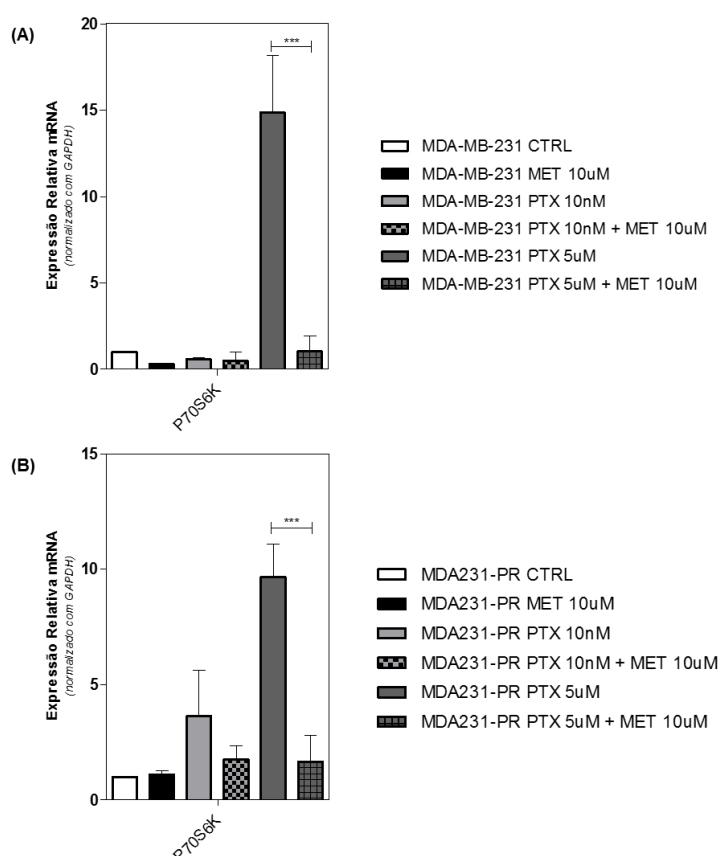


Figura 26 - Adição de MET ao tratamento com PTX modula a expressão de P70S6K. Análise da expressão de mRNA por qPCR nas linhagens de CAM MDA-MB-231 (A) e MDA231-PR (B) empregando-se GAPDH como controle interno. Os experimentos foram realizados em triplicatas ( $n=3$ ) e Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. \* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$

## 6. CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho nos permitem concluir que:

- Metformina em monoterapia é capaz de inibir a proliferação celular em linhagens triplo-negativas com perfis moleculares distintos. Adicionalmente, inibiu a formação de colônias nas linhagens analisadas exibindo um perfil de maior sensibilidade nas linhagens TNBC.
- A adição de da metformina, em doses clinicamente relevantes, ao tratamento com doxorrubicina e paclitaxel potencializou significativamente a inibição da proliferação celular causada pelos quimioterápicos. Entretanto o mesmo efeito não foi observado quando combinamos cisplatina e metformina nas linhagens TNBC HCC70 e MDA-MB-231; e Luminal A MCF-7.
- Dada a relevância do subtipo TNBC, que congrega tumores majoritariamente agressivos e quimiorresistentes, desenvolvemos com sucesso linhagem resistente ao paclitaxel por meio de tratamentos intermitentes com o taxano (linhagem triplo negativa MDA231-PR e luminal A MCF7-PR).
- As linhagens resistentes apresentaram alterações morfológicas marcantes quando comparadas às linhagens parentais. Em ambos os modelos de resistência observamos um aumento no volume celular, morfologia “achatada” com múltiplos vacúolos e extensa pseudopodia além de marcação positiva SA- $\beta$ -GAL, clássico marcador de senescência. Adicionalmente, verificamos aumento de expressão dos inibidores de CDKs, CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>), CDKN1A (p21<sup>WAF1</sup>) e CDKN1B (p27<sup>kip1</sup>) nas linhagens resistentes ao paclitaxel (MDA231-PR e MC7-PR) (Figura 27)
- Determinamos que a linhagem MDA231-PR exibiu fenótipo SASP, com aumento da expressão de IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , após a aquisição da resistência ao paclitaxel. Verificamos ainda, que o sobrenadante da linhagem resistente apresentava maior concentração de IL-6 comparado com a linhagem parental.
- Foi possível notar aumento nos marcadores de CSC na linhagem MDA231-PR quando comparada à linhagem parental (CD24, CD44, NANOG e ESA),

possivelmente induzido pelas citocinas que compõe o SASP, IL-6 e IL-8, produzidas pelas células senescentes (Figura 27).

- Notamos o aumento da expressão gênica e proteica de p70S6K na linhagem resistente ao paclitaxel, importante efetor da via de mTOR, regulador da sobrevivência, crescimento celular, proliferação e motilidade (Figura 27).

- Constatamos ainda, aumento da ativação de ERK1/2 na linhagem MDA231-PR, fenômeno que pode estar relacionado às citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 de forma autócrina e parácrina pelas células tumorais (Figura 27).

- Adicionalmente notamos diminuição na fosforilação de GSK-3 $\beta$  e consequente inativação da proteína na linhagem MDA231-PR, provavelmente provocando a ativação da via de Wnt/ $\beta$ -catenina (Figura 27).

- Constatamos a diminuição da expressão proteica de Bax na linhagem MDA231-PR, indicando uma diminuição na ativação das vias de indução de apoptose (Figura 27).

- Observamos que não houve mudanças na expressão de Beclina-1 e aumento de LC3B (LC3B/LC3BII), na linhagem resistente ao paclitaxel, marcadores de autofagia (Figura 27).

- Nossos resultados experimentais revelam ainda que o cotratamento com metformina na indução da resistência ao paclitaxel não alterou a morfologia celular observada e a marcação de SA- $\beta$ -GAL na linhagem MDA231-PR.

- Meio condicionado da MDA231-PR conferiu resistência ao paclitaxel na linhagem parental MDA-MB-231, provavelmente relacionado ao significativo aumento na secreção de IL-6 observada no sobrenadante da linhagem resistente.

- Tratamento com metformina modulou a expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) na linhagem resistente ao paclitaxel. Adicionalmente o tratamento combinado de metformina e paclitaxel alterou de maneira distinta a expressão das citocinas nas duas linhagens analisadas (MDA-MB231 vs MDA231-PR) (Figura 27).

- Observamos uma reversão no aumento da expressão gênica de P70S6K nos cotratamentos com metformina, em doses clinicamente relevantes, e alta dose de paclitaxel tanto na linhagem resistente ao taxano quanto na linhagem parental (Figura 27).

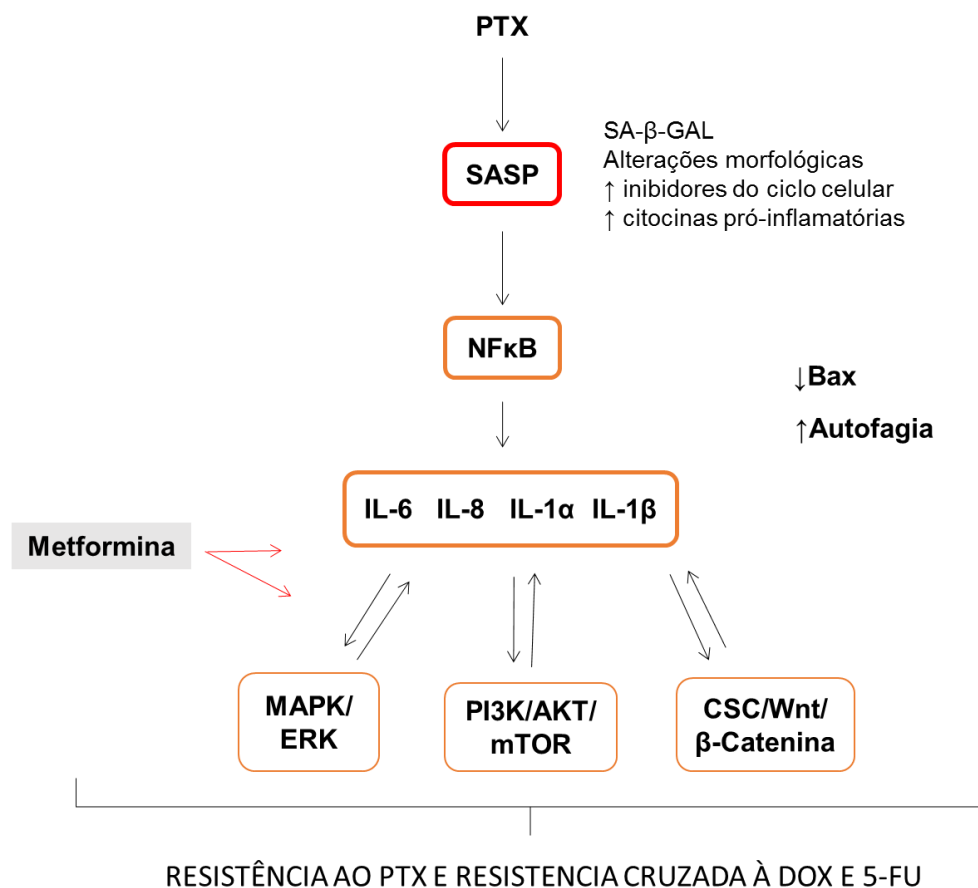


Figura 27 - Modelo dos mecanismos celulares possivelmente modulados pelos tratamentos intermitentes com paclitaxel na variante gerada MDA231-PR. As setas em preto representam as ações intracelulares provocadas pela indução da SASP. As setas em vermelho representam as vias moduladas pela metformina nos tratamentos realizados em monoterapia ou em combinação com o taxano.

## 7. PERSPECTIVAS

Dada a relevância clínica do presente estudo, nosso grupo pretende prosseguir com as investigações da aplicabilidade da metformina em regimes terapêuticos contra o TNBC, principalmente nos tumores quimiorresistentes, conforme descrito a seguir:

- Investigar a resistência cruzada à outros quimioterápicos relevantes no tratamento do câncer de mama na MCF7-PR.
- Analisar o benefício do tratamento com metformina nas linhagens resistentes ao paclitaxel, nos ensaios de western-blot.
- Avaliar a expressão do NFκB em extratos nucleares e citoplasmáticos.
- Avaliar o efeito dos tratamentos com metformina na concentração de IL-6 e IL-1β no sobrenadante das linhagens de câncer, além de expandir o painel de citocinas pró-inflamatórias analisadas.
- Finalizar a caracterização da linhagem resistente MCF7-PR
- Investigar o efeito do pré-tratamento/tratamentos prolongados com metformina na indução da resistência nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

## 8. REFERÊNCIAS

- AJABNOOR G. M. A. et al. Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 3, n.1, p. e260, 2012
- ACHUTHAN S. et al. Drug-induced senescence generates chemoresistant stem like cells with low reactive oxygen species. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 43, p. 37813-37829, 2011.
- ACOSTA J. C. et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. **Cell**, v. 133, p.1006–1018, 2008.
- ACOSTA J. C. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. **Nature Cell Biology**, v. 15, p. 978–990, 2013
- AHMED S.; SAMI A.; XIANG J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer**, v. 22, n. 2, p. 101-116, 2015.
- ALIMOVA I. N. et al. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. **Cell Cycle**, v. 8, n. 6, p. 909–915, 2009.
- ALISON, M. R.; LIM, S. M. L.; NICHOLSON, L. J. Cancer stem cells: problems for therapy? **The Journal of Pathology**, v. 223, n. 2, p. 147–161, 2011.
- ALJADA A.; MOUSA S. A.; Metformin and neoplasia: implications and indications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.133, n.1, p.108-115, 2012.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts and Figures 2017. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/document/document/acspc-036845.pdf>>. Acesso em: 20 de Julho de 2017.
- ANDREI C. et al. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 9745–9750, 2004.
- ANDREOPOULOU E. et al. Therapeutic Advances and New Directions for Triple-Negative Breast Cancer. **Breast Care**, v. 12, n.1, p. 21-28, 2017.
- ASGHAR U. et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. **Nature Review Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 130–146, 2015.
- BAILEY, C. J.; TURNER, R. C. Drug Therapy: Metformin. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 9, p. 574-579, 1996.
- BANNISTER C. A. et al. People with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.16, p. 1165-1173, 2014.

- BEAUSÉJOUR C.M. et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. **EMBO Journal**, v.22, n.16, p. 4212-4222, 2003.
- BERTUCCI F.; CERVERA N. & BIRNBAUM D. A gene signature in breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 356: 1887-1888, 2007.
- BHOSLE J.; HALL G. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**, v. 27,n. 4, p. 173-177, 2009.
- BIANCHINI G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 11, p. 674-690, 2016.
- BINES J. et al. Anthracyclines and taxanes in the neo/adjuvant treatment of breast cancer: does the sequence matter? **Annals of Oncology**, v. 25, n.6, p. 1079-1085, 2014.
- BLAGOSKLONNY M.V. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: Terminology for TOR-driven aging. **Aging**, v.4, p. 159–165, 2012.
- BODMER M. et al. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. **Diabetes Care**, v. 33, n.6, p.1304-1308, 2010.
- BONANNI B. et al. Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 21, p. 2593–2600, 2012.
- BRINGOLD F.; SERRANO M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 317-329, 2000.
- BULL, S. B. et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplifications is associated with poor survival in node-negative breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 1, p. 86-96, 2004.
- BUSS H. et al. Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 48, p. 49571-49574, 2004.
- CAMPISI J.; D'ADDA DI FAGAGNA F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 729-740, 2007.
- CAMPISI J. Aging, cellular senescence, and cancer. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 685–705, 2013.
- CAPPARELLI C. et al. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, 'fueling' tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. **Cell Cycle**, v. 11, p. 3599–3610, 2012.
- CAPECE D. et al. Cancer Secretome and Inflammation: The Bright and the Dark Sides of NF-κB. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.16, p. 30485-30482, 2017.



CAREY L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **The Journal of American Medical Association**, v. 295, n. 21, p. 2492-2502, 2006.

CAREY, L. A. et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 8, p. 2329-2334, 2007.

CAREY L. A. et al. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 7, n. 12, p. 683-692, 2010.

CARNERO A. et al. The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy. **Cancer Treatment Reviews**, v.49, p. 25-36, 2016.

CHANG C.H. et al. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. **International Journal of Cancer**, v.132, n.9, p.1977–1985, 2013.

CHARFARE, H.; LIMONGELLI, S.; PURUSHOTHAM, A. D. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **The British Journal of Surgery**, v. 92, n. 1, p. 14-23, 2005.

CHAVEY C. et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. **Breast Cancer Research**, v. 9 n.1, p.R15, 2007.

CHE et al. Interleukin 6 promotes endometrial cancer growth through an autocrine feedback loop involving ERK–NF-κB signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 1, p. 167–172, 2014.

CHEANG M. C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients with Luminal B Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

CHEN K. & SHI W. Autophagy regulates resistance of non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. **Tumour Biology**, n.37, v. 8, p.10539-10544, 2016.

CHEN Y. Q. & CHEN G. Combined therapeutic effect and molecular mechanisms of metformin and cisplatin in human lung cancer xenografts in nude mice. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 11, n. 2, p 324-330, 2015.

CHEN X. et al. Non-anthracycline-containing docetaxel and cyclophosphamide regimen is associated with sustained worse outcome compared with docetaxel, anthracycline and cyclophosphamide in neoadjuvant treatment of triple negative and HER2-positive breast cancer patients: updated follow-up data from NATT study. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 28, n.6, p. 561-569, 2016.

CHICHE A. et al. Injury-Induced Senescence Enables in vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 3, p. 407-414, 2017.

CHILDS B. G. et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. **Nature Medicine**, v. 21, p. 1424-1435, 2015.

CHO et al. Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 11, p. 8709-8721, 2015.

CHRISTENSEN A.G. et al. Elucidation of Altered Pathways in Tumor-Initiating Cells of Triple-Negative Breast Cancer: A Useful Cell Model System for Drug Screening. **Stem Cells**, v. 35, n. 8, p. 1898-1912, 2017

COJOC M. et al. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 16-27, 2015.

COLAK S. & MEDEMA J.P. Cancer stem cells--important players in tumor therapy resistance. **FEBS Journal**, v. 281, n.21, p. 4779-4791, 2014.

CONNOLLY J. et al. Recommendations for the reporting of breast carcinoma. **Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology**, 2004.

CONZE D. et al. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. **Cancer Research**, v.61, p. 8851–8858, 2001.

COOKE J. P. et al. Response to Letter Regarding Article "Transdifferentiation of Human Fibroblasts to Endothelial Cells: Role of Innate Immunity". **Circulation**, v. 132, n.15, p. e197, 2015.

COPPÉ J. P. et al. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 29568–29574, 2006.

COPPÉ J. P. et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. 2853-2868, 2008.

CORTAZAR P. et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **Lancet**, v. 384 v. 9938 p. 164-172, 2014.

CZABOTAR P.E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cellular Biology**, v. 15, n1, p. 49-63, 2014.

DEFRONZO, R. A., GOODMAN, A. M. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 9, p. 541-549, 1995.

DEMARIA M. et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. **Developmental Cell**, v. 31, p. 722–733, 2014.

DEMARIA M. et al. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 2, p. 165-176, 2016.

DEMIDENKO Z.N. et al. Rapamycin decelerates cellular senescence. **Cell Cycle** v. 8, p. 1888–1895, 2009.

DESCHÊNES-SIMARD X. et al. **Cellular senescence and protein degradation**. *Cell Cycle*, v. 13, n.12, p. 1840–1858, 2014.

DIMRI G. P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9363-9367, 1995.

DINARELLO C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v.27, p. 519–550, 2009.

DING et al. ERK Associates with and Primes GSK-3 $\beta$  for Its Inactivation Resulting in Upregulation of  $\beta$ -Catenin. **Molecular Cell**, v. 9, n. 2, p. 159-170, 2005.

DOWLING R. J. et al. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 22, p. 10804-10812, 2007.

DOWLING R. J. et al. Metformin pharmacokinetics in mouse tumors: Implications for human therapy. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 567-568, 2016.

DOWSETT M. et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 22, p. 1656-1664, 2011.

DUPONT N. et al. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ . **EMBO Journal**, v. 30, n. 23, p. 4701-4711, 2011.

EARL H.M. et al. Effects of the addition of gemcitabine, and paclitaxel-first sequencing, in neoadjuvant sequential epirubicin, cyclophosphamide, and paclitaxel for women with high-risk early breast cancer (Neo-tAnGo): an open-label, 2x2 factorial randomised phase 3 trial. **Lancet Oncology**, v. 15, p. 201-212, 2014.

ELMORE L.W. et al. Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 35509–35515, 2002.

ERENPREISA J. & CRAGG M.S. Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal. **Cancer Cell International**, v. 13, n.1, p. 92, 2013;

ERICES R. et al. Metformin, at concentrations corresponding to the treatment of diabetes, potentiates the cytotoxic effects of carboplatin in cultures of ovarian cancer cells. **Reproductive Science**, v. 20, n.12, p. 1433–1446, 2013.

ESPINOZA J.A. et al. Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 12, p. e1248015, 2016.

FANG X. et al. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n. 22, p. 11960-11965, 2000.

FREEDMAN, G. M. et al. Locoregional recurrence of triple-negative breast cancer after breast-conserving surgery and radiation. **Cancer**, v. 115, n. 5, p. 946-951, 2009.

FILLMORE C. M. & KUPERWASSER C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. **Breast Cancer Research**, v.2 p.R25, 2008;

GARBERS C. et al. Cellular senescence or EGFR signaling induces interleukin 6 (IL-6) receptor expression controlled by mammalian target of rapamycin (mTOR). **Cell Cycle** v. 12, p. 3421–3432, 2013

GERASHCHENKO B.I. et al. Disentangling the aneuploidy and senescence paradoxes: a study of triploid breast cancers nonresponsive to neoadjuvant therapy. **Histochemical and Cellular Biology**, v. 145, p. 497-452, 2016.

GERLAND L. M. et al. Association of increased autophagic inclusions labeled for  $\beta$ -galactosidase with fibroblastic aging. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 887–895, 2003.

GERRATANA et al. Do platinum salts fit all triple negative breast cancers? **Cancer Treatment Reviews**, v. 48, p. 34-41, 2016.

GLICK D., BARTH S. & MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n.1, p.3–12, 2010.

GOEHE R. W. et al. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, n. 3, p. 763-778, 2012.

GOLDHIRSCH A. et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 7, p. 1133-1144, 2007.

GOLDMAN A. et al. Temporally sequenced anticancer drugs overcome adaptive resistance by targeting a vulnerable chemotherapy-induced phenotypic transition. **Nature Communications**, v. 11, n.6, article number 6139, 2015.

GONG L. et al. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacogenetics Genomics**, v. 22, n.11, p. 820-827, 2012.

GONZALEZ-ANGULO A. M. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, p. 1082–1089, 2011.

GUERTIN, D. A; SABATINI, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. **Cancer cell**, v. 12, n. 1, p. 9-22, 2007.

GUIMARAES I. S. Avaliação *in vitro* do efeito da metformina no tratamento de câncer de mama triplo negativo. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)**, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2013.

GUIMARAES I. S. et al. Conventional Cancer Treatment. In: Cancer treatment: Conventional and innovative approaches, Chapter 1, **In Tech**, p. 3-39, 2013.

GUIMARAES I. S. et al. Chemosensitizing effects of metformin on cisplatin- and paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines. **Pharmacological Reports**, In Press, Accepted Manuscript.

GUO B. et al. Cross-resistance studies of isogenic drug-resistant breast tumor cell lines support recent clinical evidence suggesting that sensitivity to paclitaxel may be strongly compromised by prior doxorubicin exposure. **Breast Cancer Research and Treatment**, v 85, p. 31–51, 2004.

HADAD S. et al. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 128, n. 3, p. 783-794, 2011.

HAFFTY B. G. et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 36, 2006.

HAN X et al. AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD(+) elevation. **Aging Cell**, 15(3):416-427, 2016.

HANSEN S.N. et al. Acquisition of docetaxel resistance in breast cancer cells reveals upregulation of ABCB1 expression as a key mediator of resistance accompanied by discrete upregulation of other specific genes and pathways. **Tumor Biology**, v. 35, n. 6, p. 4327–4338, 2015

HARDIE D. G. Neither LKB1 nor AMPK are the direct targets of metformin. **Gastroenterology**, v. 131, n. 3, p. 973, 2006.

HARRIS J. et al. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9587-9597, 2011.

HARRIS L.N. et al. Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 6, R66, 2006

HARTMAN Z.C. et al. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8, **Cancer Research**, v. 73, n.11, p. 3470-3480, 2013.

HE X. et al. Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 7, p. 1771-1780, 2012.

HEITZ F. et al. Cerebral metastases in metastatic breast cancer: disease-specific risk factors and survival. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 7, p. 1571-1581, 2011.

HENDERSON I.C et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n.6, p. 976-983, 2003.

HERRANZ N. et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 8, p. 1205-1217, 2015.

HIRSCH H. A. et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. **Cancer Research**, v.69, n.19, p. 7507-751, 2009.

HOARE M.; YOUNG A.R.J.; NARITA M. Autophagy in cancer: Having your cake and eating it. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, p. 397–404, 2011.

HOLEN I. et al. IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, p. 75571-75584, 2016.

HON J. D. C. et al. Breast cancer molecular subtypes: From TNBC to QNBC. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 9, p. 1864–1872, 2016.

HORIUCHI T. J et al. Metformin directly binds the alarmin HMGB1 and inhibits its proinflammatory activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 20, p. 8436-8446, 2017.

HUFFMAN D. M. et al. Evaluating health span in preclinical models of aging and disease: guidelines, challenges, and opportunities for geroscience. **The Journal of Gerontology**, v. 71,n. 11, p. 1395-1406, 2016.

HUNZ M. et al. Plasma and tissue pharmacokinetics of epirubicin and Paclitaxel in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for locally advanced primary breast cancer. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 5, p. 659-668, 2007.

HURVITZ S. & MEAD M. Triple-negative breast cancer: advancements in characterization and treatment approach. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 28, n.1, p. 59-69, 2016.

IANNELLO A. et al. p53-dependent chemokine production by senescent tumour cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. **Journal of experimental medicine**, v. 210, p. 2057–2069, 2013.

ILIOPOULOS D. et al. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.4, p.1397–1402, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. ESTIMATIVA 2016 – Incidência de Câncer no Brasil, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>>. Acesso em: 15 de Julho de 2017.

JIANG D. et al. PAR2 activates autocrine IL-8 signaling pathway to promote proliferation and migration of colorectal cancer cells. **International Journal of Clinical and. Experimental Pathology**, v. 10 n. 5, p. 5600-5605, 2017.

JIANG S. et al. Secretory vs. Degradative Autophagy: Unconventional Secretion of Inflammatory Mediators. **Journal of Innate Immunology**, v. 5, n. 5, p. 471–479, 2013.

JIN L. et al. Expression of interleukin-1beta in human breast carcinoma. **Cancer**, v. 80, n. 3, p. 421-434, 1997.

JEONG Y. et al. Breast cancer cells evade paclitaxel-induced cell death by developing resistance to dasatinib. **Oncology Letters**, n. 12v. 3, p. 2153–2158, 2016.

KALENDER A. et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. **Cell Metabolism**, v. 11, n. 5, p. 390-401, 2010.

KANG T. W. et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. **Nature**, v. 479, p. 547–551, 2011.

KANG C. et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. **Science**, v. 349, p. 6255, 2015.

KAO J. et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. **Plos One**, v. 4, n. 7, p. e6146, 2009.

KARIMI-BUSHERI F. et al. **Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells**. Breast Cancer Research, v. 12, n 3, p. R31, 2010.

KARS M. D. et al. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. **Anticancer Research**, v. 26, n. 6B, p. 4559-4568, 2006.

KASHIWAGI S. et al. Advantages of adjuvant chemotherapy for patients with triple-negative breast cancer at Stage II: usefulness of prognostic markers E-cadherin and Ki67. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. R122, 2011.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573–584, 2007.

KELLEN M. T., AMIN E. F. & ABDELRAHMAN A. M. Effect of metformin and sitagliptin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: impact of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. **Journal of Toxicology**, p. 424813, 2015.

KERBEL R. S. et al. Intrinsic or acquired drug resistance an metastasis: are they linked phenotypes? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 56, p. 37–47, 1994.

KIM S. et al. MEK-dependent IL-8 induction regulates the invasiveness of Triple-Negative Breast Cancer Cells. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4991–4999, 2016

KIM, W. Y. & SHARPLESS, N. E. The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. **Cell**, v. 127, p. 265-275, 2006.

KOBASHIGAWA L. C. et al. Metformin protects cardiomyocyte from doxorubicin induced cytotoxicity through an AMP-activated protein kinase dependent signaling pathway: an in vitro study. **Plos One**, v. 9 n. 8, p. e104888, 2014.

KORKAYA H. et al. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. **Molecular Cell**, v.47,n. 4, p. 570-584, 2012.

KOZHUKHAROVA I et al. Therapeutic doses of doxorubicin induce premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from menstrual blood,

bone marrow and adipose tissue. **International Journal of Hematology**, In Press, 2017.

KRISHNAMURTHY J. et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 9, p. 1299-1307, 2004.

KRISHNAMURTHY S. et al. Endothelial interleukin-6 defines the tumorigenic potential of primary human cancer stem cells. **Stem Cells**, v.32, n.11, p. 2845-2857, 2014.

KUILMAN T. et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1019-31, 2008.

LABERGE R. M. et al. Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. **Aging Cell**, v.11, n.4, p. 569-578, 2012.

LABERGE R. M. et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. **Nature Cell Biology**, v.17, n. 8, p. 1049-1061, 2015

LARSSON, S. C.; MANTZOROS, C. S.; WOLK, A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 4, p. 856-862, 2007.

LASRY A. & BEN-NERIAH Y. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. **Trends in Immunology**, v.36, n.4, p. 217-228, 2015

LEHMANN B. D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **Plos One**, v. 11, p. 1-22, 2016.

LEVINA V. et al. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. **Plos One**, v. 3, n. 8, p e3077, 2008.

LI L. et al. Metformin sensitizes EGFR-TKI-resistant human lung cancer cells in vitro and in vivo through inhibition of IL-6 signaling and EMT reversal. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 10, p. 2714-2726, 2014.

LI W.J. et al. Systematic expression analysis of genes related to multidrug-resistance in isogenic docetaxel- and adriamycin-resistant breast cancer cell lines. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 11, p. 6143–6150, 2013.

LIANG S et al. Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF-κB/IL-6 signals. **Cancer Letters**, v.386, p. 12-23, 2017.

LIEDTKE, C. et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1275-1281, 2008.

LIU B. et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 13, p. 2031-2040, 2009.



LIU D. & HORNSBY P.J. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3117-3126, 2007.

LIU H. et al. Metformin and the mTOR inhibitor Everolimus (rad001) Sensitize Breast Cancer Cells to the Cytotoxic Effect of Chemotherapeutic Drugs in vitro. **Anticancer Research**, v. 32, n. 5, p.1627-1638, 2012.

LIU J. et al. Targeting the mTOR pathway in breast cancer. **Tumour Biology**, v. 39, n. 6 p.1010428317710825, 2017.

LIU R. et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. **New England Journal of Medicine**, v.356: 217-226, 2007.

LIU Z. et al. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. **Medical Research Reviews**, v. 36, n. 2, p. 313-342, 2016.

LOGAN C.Y. & NUSSE R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p. 781–810, 2004

LOPEZ-CASTEJON G. & BROUGH D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. **Cytokine Growth Factor Review**, v.22, n. 4, p.189–195, 2011.

MACKENZIE A. et al. A. Rapid secretion of interleukin-1 $\beta$  by microvesicle shedding. **Immunity**, v.15, p. 825–835, 2001.

MADEIRA K. P. et al. Triple negative breast cancer: clinicopathological characteristics, challenges and therapy. In: CHEN, G. (Ed.). **Estrogen Receptors: Mechanisms, Structure and Role in Disease**. New York: Nova Publishers, cap. 7, 2012.

MALAQUIN M. et al. Senescent fibroblasts enhance early skin carcinogenic events via a paracrine MMP-PAR-1 axis. **Plos One**, v. 8, n.5, p. e63607, 2013.

MARTIN H.L. et al. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. **Breast Cancer**, v. 10, n. 6, p. 1-13, 2014.

MCDERMOTT M. et al. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. 40, p. 1-16, 2014.

MILLER T.W. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v.13, n. 6, p. 224, 2011.

MINAMI, C. A.; CHUNG, D.U.; CHANG, H.R. Management options in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer (Auckl)**, v. 5; p. 175–199, 2011.

MOISEEVA O. et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- $\kappa$ B activation. **Aging Cell**, v. 12, n. 3 p. 489-498, 2013.

MUÑOZ-ESPÍN D. et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. **Cell**, v. 155, p. 1104–1118, 2013.

MURUGAN, A. K.; ALZHRANI, A.; XING, M. Mutations in critical domains confer the human mTOR gene strong tumorigenicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 2, p. 6511–6521, 2013.

NAHLEH Z. A. et al. SWOG S0800 (NCI CDR0000636131): addition of bevacizumab to neoadjuvant nab-paclitaxel with dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide improves pathologic complete response (pCR) rates in inflammatory or locally advanced breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, v.158, n. 3, p. 485-495, 2016.

NAGATA T. et al. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. **Breast Cancer**, v.21, n. 1, p. 96-101, 2014.

NAGATA T. et al. KLF4 and NANOG are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. **Breast Cancer**, v. 24, n. 2, p. 326–335, 2017.

NARITA M. et al. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. **Science**, v. 332, p. 966–970, 2011.

NELSON G. et al. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. **Aging Cell**, v. 11, p. 345–349, 2012.

NEVE R. M. et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**, v. 10, n. 6, p. 515-527, 2006.

NIRAULA S. et al. Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, n. 3, p. 821-830, 2012.

OHANNA M. et al. Cells develop a PARP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-associated secretome (PNAS). **Genes Development**, v. 25, p. 1245-126, 2011.

ORJALO A. V. et al. Cell surface-bound IL-1 $\alpha$  is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 6; n. 106(40), p.17031-17036, 2009.

O'SHAUGHNESSY J. et al. Patients with Slowly Proliferative Early Breast Cancer Have Low Five-Year Recurrence Rates in a Phase III Adjuvant Trial of Capecitabine. **Clinical Cancer Research**, v.21, p. 4305–4311, 2015.

OWEN M. R.; DORAN E.; HALESTRAP A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **The Biochemical Journal**, v.348, n.3. p. 607-614, 2000.

PAGE D. L. Prognostic indicators in breast cancer and who needs them. **Anatomic Pathology**, v. 2; p. 35–52, 1997.

PALMA G. et al. Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. **Oncotarget**, v. 29, n. 6, 26560-26574, 2015.

PARRINELLO S. et al. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: Senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. **The Journal of Cell Science**, v.118, p. 485–496, 2005.

- PÉREZ-MANCERA P. A.; YOUNG A. R.; NARITA M. Inside and out: the activities of senescence in cancer. **Nature Review Cancer**, v. 14, n8, p. 547-558, 2014.
- PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.
- POELE R. H et al. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Research**, n 62, p. 1876–1883, 2002.
- PRADERE J. P, DAPITO D. H & SCHWABE R. F. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. **Oncogene**, v. 33, p. 3485-3495, 2014.
- PRAT A. et al. Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. **The Oncologist**, v. 18, n. 2, p.123-133, 2013.
- PRAT A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.
- PRATA.; PEROU C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p. 5-23, 2010.
- QI X. et al. Metformin sensitizes the response of oral squamous cell carcinoma to cisplatin treatment through inhibition of NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  signal axis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 35788, 2016
- RADISKY D. C. et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. **Nature**, v. 7, n. 436, p. 123-127, 2005.
- RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010.
- REED J. R. et al. Interleukin-1 $\beta$  and fibroblast growth factor receptor 1 cooperate to induce cyclooxygenase-2 during early mammary tumorigenesis. **Breast Cancer Research**, v.11, n.2, p. R21, 2009.
- ROUZIER R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 16, p. 5678-5685, 2005.
- SAITOH T. et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. **Nature**, v.456, n. 7219, p. 264-268, 2008.
- SAMUELS Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, n.5670, p. 554. 2004
- SANGUINETTI A. et al. Interleukin-6 and pro inflammatory status in the breast tumor microenvironment. **World Journal of Surgical Oncology**, v.13, p. 129, 2015.
- SANOFF H.K. et al. Effect of cytotoxic chemotherapy on markers of molecular age in patients with breast cancer. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n.4, 2014.

SANSONE P. et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. **Journal of Clinical Investigation**, v.117, n. 12, p. 3988–4002, 2007.

SHARIFI S et al. Roles of the Bcl-2/Bax ratio, caspase-8 and 9 in resistance of breast cancer cells to paclitaxel. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 20, p. 8617-8622, 2014.

SASAKI M. et al. Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. **Laboratory Investigation**, v. 90, p. 835–843, 2010.

SENKUS E. et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 5, p. 8-30, 2015

SHAO N. et al. Sequential versus concurrent anthracyclines and taxanes as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of phase III randomized control trials. **Breast**, v. 21, p. 389–393, 2012

SHAO N. et al. The depletion of interleukin-8 causes cell cycle arrest and increases the efficacy of docetaxel in breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 431, n.3, p. 535-541, 2013.

SHAO Z. et al. Cbcs-10: Adjuvant capecitabine in combination with docetaxel and cyclophosphamide plus epirubicin for triple negative breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, n. 34 abstract 1012, 2016

SHARPLESS N.E.; SHERR C.J. Forging a signature of in vivo senescence. **Nature Review Cancer**, v. 15, n. 7, p. 397-408, 2015.

SHIRASAKI Y. et al. Real-time single-cell imaging of protein secretion. **Science Reports**, v. 4, p.4736, 2014.

SINGH J. K. et al. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 4, p. 210, 2013.

SOARES H. P. et al., Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. e57289, 2013.

STAGE T. B.; BERGMANN T. K.; KROETZ D. L. Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel Monotherapy: An Updated Literature **Review Clinical Pharmacokinetics**, v. 56, p1-13, 2017.

STAMBOLIC V. et al. Utility of metformin in breast cancer treatment, is neoangiogenesis a risk factor? **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 114, n. 2, 2009.

STEIN G. H. et al. Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. **Molecular Cell Biology**, v.19, n. 3, p. 2109–2117, 1999.

STUDEBAKER A.W. et al. Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an

interleukin-6-dependent manner. **Cancer Research**, v.68, n. 21, p. 9087-9095, 2008.

SUTHERLAND C.; LEIGHTON I.A. & COHEN P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. **Biochemical Journal**, v. 296, p. 15-9, 1993.

TAYLOR S. et al. Microenvironment acidity as a major determinant of tumor chemoresistance: proton pump inhibitors (PPIs) as a novel therapeutic approach. **Drug Resistance Updates**, v. 23, n. 23, p. 69–78, 2015.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Eds.) World Health Organization: Tumors of the Breast and Female Genital Organs (2nd edn.). **IARC Press**, Lyon: WHO/IARC, 2003.

THOMAS S. et al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 17, n1, p. 61–75, 2013.

VAKLAVAS, C.; FORERO-TORRES, A. How do I treat "triple-negative" disease. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 12, n. 4, p. 369-388, 2011.

VAZQUEZ-MARTIN A. et al. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. **Cell Cycle**, v.9, n. 18, p. 3807-3814, 2010.

VIALE G. The current state of breast cancer classification. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 10, p. 207-210, 2012.

WAJAPPEYEE N. et al. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. **Cell**, v. 132, p. 363–374, 2008.

WANG F. et al. Metformin inhibited esophageal squamous cell carcinoma proliferation *in vitro* and *in vivo* and enhanced the anti-cancer effect of cisplatin. **Plos One**, v. 12, n. 4, p. e0174276, 2017.

WANG, J. et al. A Non-canonical MEK/ERK Signaling Pathway Regulates Autophagy via Regulating Beclin 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 32, p. 21412-21424, 2009.

WANG S. et al. Characterization of IGFBP-3, PAI-1 and SPARC mRNA expression in senescent fibroblasts. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 92, n. 2-3, p.121-132, 1996.

WAS H. et al. Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features. **Cancer Biology & Therapy**, v. 19, n.1, p. 63-75, 2018.

WEBER A.; WASILIEW P.; KRACHT M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Science Signaling**, v. 19, n. 3, p.1-6, 2010.

WEBSTER M. R. et al. Wnt5A promotes an adaptive, senescent-like stress response, while continuing to drive invasion in melanoma cells. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 28, p. 184–195, 2015.

WEGIEL B. et al. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 7, p. 1521–1529, 2008.

WEIGELT B.; REIS-FILHO J. S. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. **Breast Cancer Research**, v 12, n. 4, p. 2734, 2010.

WELDON C. B. et al. NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. **Surgery**, v. 130, n. 2, p. 143–150, 2001.

WEN J. et al. Autophagy inhibition re-sensitizes pulse stimulation-selected paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 149, n.3, p. 619-629, 2015

WIND N. S.; HOLEN I. Multidrug Resistance in Breast Cancer: From in vitro Models to Clinical Studies. **International Journal of Breast Cancer**, v 2011, p.1-12, 2011.

WOLFF A. C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 1, p.118-145, 2007.

WU J. et al. Response and prognosis of taxanes and anthracyclines neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 10, p. 1505-1510, 2011.

WÜRTH R. et al. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. **Drug Discovery Today**, v. 21; n. 1; p. 190-199, 2016.

XU H. et al. K Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 431-444, 2016.

XUE C. Targeting P-glycoprotein function, p53 and energy metabolism: Combination of metformin and 2-deoxyglucose reverses the multidrug resistance of MCF-7/Dox cells to doxorubicin. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8622–8632, 2017.

XUE W. et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. **Nature**, n. 445, p. 656–660, 2007.

YAGATA H.; KAJIURA Y.; YAMAUCHI H.; Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. **Breast Cancer**, v, 8, n.3, p. 165-173, 2011.

YANG X. R. et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 3, p. 439-443, 2007.

YOUNG A. R. J. et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. **Genes Development**, v. 23, p. 798–803, 2009

ZASADIL L. M. et al. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. **Science Translational Medicine**, v. 6, p. 229ra43, 2014.

ZHAO Z. et al. Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis. **Plos One**, v. 30, n. 9, p. e95884, 2014.

ZHENG H.C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. **Oncotarget**, v.6, n. 8, p. 35, 2017.

ZINDY F. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. **Oncogene**, v. 10, n.15, p. 203-211, 1997.

## ANEXO I



# **TITLE: CHEMOSENSITIZING EFFECTS OF METFORMIN ON CISPLATIN- AND PACLITAXEL-RESISTANT OVARIAN CANCER CELL LINES**

**Authors:** Isabella dos Santos Guimarães<sup>1, 2</sup>, Taciane Ladislau-Magescky<sup>3</sup>, Nayara Gusmão Tessarollo<sup>1</sup>, Diandra Zipinotti dos Santos<sup>4</sup>, Etel Rodrigues Pereira Gimba<sup>5, 6</sup>, Cinthya Sternberg<sup>7, 8</sup>, Ian Victor Silva<sup>1, 9</sup>, Leticia Batista Azevedo Rangel<sup>1, 4, 10</sup>

## **Affiliation and address:**

<sup>1</sup> Biotechnology Program/RENORBIO, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>2</sup> Clinical Research Division, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup> Pitágoras University, Linhares, ES, Brazil

<sup>4</sup> Post-Graduate Program of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>5</sup> Natural Sciences Department, Health and Humanities Institute, Fluminense Federal University, Rio das Ostras, RJ, Brazil.

<sup>6</sup> Research Coordination, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>7</sup> Brazilian Society of Clinical Oncology, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>8</sup> Post-Graduate Program of Anatomic Pathology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>9</sup> Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>10</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

Address: Avenida Marechal Campos, nº1468, Maruípe, Vitória, Espírito Santo, Brasil.  
Departamento de Ciências Farmacêuticas, 2º Andar, Sala 8, CEP: 29043-900, Phone: +55-27-33357539

**E-mail address /telephone of the corresponding author:** email: lbarangel@yahoo.com/  
Telephone: +552733357539

## **ABSTRACT**

**Background:** Epithelial ovarian cancer (EOC) remains the most lethal gynecologic malignancy. Primary cytoreductive surgery with adjuvant taxane-platinum chemotherapy is the standard treatment to fight ovarian cancer, however, their side effects are severe, and chemoresistance emerges at high rates. Therefore, EOC clinic urges for novel treatment strategies to reverse chemoresistance and to improve the survival rates. Metformin has been shown to act in synergy with certain anti-cancer agents, overcoming chemoresistance in various types of tumors. This paper aims to investigate the use of metformin as a new treatment option for cisplatin- and paclitaxel-resistant ovarian cancer.

**Methods:** The effects of metformin alone or in combination with conventional drugs on resistant EOC cell lines were investigated using the MTT assay for cell proliferation; Flow Cytometry analysis for cell cycle and the mRNA expression was analyzed using the real-time PCR technique.

**Results:** We found that metformin exhibited antiproliferative effects in paclitaxel-resistant A2780-PR, and in cisplatin-resistant ACRP cell lines. The combined therapy containing conventional drugs and metformin improved the effect of the treatment in cell proliferation rate, especially in the resistant cells. We found that metformin, in clinical relevant doses, could significantly reduce the mRNA expression of inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Conclusions:** Taken together, our observations suggest that metformin inhibits the inflammatory pathway induced by paclitaxel and cisplatin treatment. Furthermore, metformin in combination with paclitaxel or cisplatin improved the sensitivity in drug-resistant ovarian cancer cells. Therefore, metformin may be beneficial treatment strategy, particularly in patients with tumors refractory to platinum and taxanes.

## INTRODUCTION

Epithelial ovarian cancer (EOC) accounts for the majority of ovarian cancers diagnosed and it is a highly heterogeneous disease [1]. This disease is often late-detected, progresses rapidly and has the ability to metastasize within the peritoneal cavity [2]. Cytoreductive surgery followed by platinum-taxane based chemotherapy is the standard of care for patients with advanced stage ovarian cancer. Despite high initial response rates, a large proportion of patients relapse, in most cases within 2 years from the diagnosis [3]. Thus, it is urgent to develop more effective treatment strategies to reverse chemoresistance and improve the survival rate for patients with EOC.

Constitutive NF- $\kappa$ B signaling has been identified in a variety of human cancers, including ovarian cancer [4]. The NF- $\kappa$ B signaling pathway is a complex network linking extracellular stimuli to cell survival and proliferation, which can be further elevated by radiation and some chemotherapeutic agents, including paclitaxel and cisplatin [5, 6]. The NF- $\kappa$ B family consists of five subunits, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), RelA (p65) and RelB [7]. The p50 and p52 products form dimeric complexes with Rel proteins, which are able to bind DNA and regulate transcription [8]. I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, which consists of two protein kinases IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  and a regulatory protein NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO also named IKK $\gamma$ ) induces the proteasomal degradation of NF $\kappa$ B inhibitory protein (I $\kappa$ B) and nuclear translocation of NF $\kappa$ B subunits [8]. Separately, the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway activates the RelB/p52 NF- $\kappa$ B complex. In this cascade, IKK $\alpha$  homodimers phosphorylate p100, resulting in its degradation and in the generation of the active p52 subunit. Dimers of p52/RelB translocate to the nucleus and activate genes including those involved in cell cycle regulation, suppression of apoptosis and inflammation [8].

Activation of NF- $\kappa$ B in tumor cells results in enhanced expression of various proinflammatory interleukins such as Interleukin-1 (IL-1) and Interleukin-6 (IL-6) [9].

Recent studies have implicated deregulated cytokine expression as a crucial aspect of many drug resistance mechanisms [10]. IL-1 and IL-6 have pleiotropic effects in various cell types being important components of the tumor microenvironment and regulating pro-oncogenic transcription factors such as NF- $\kappa$ B [11].

A series of studies strongly indicate that metformin could be a valuable adjuvant therapy for cancer, improving treatment efficacy and lower doses of chemotherapy agents in EOC [12-14]. Metformin is the first-line drug for the treatment of type 2 diabetes and substantial evidence implicates that long-term administration of metformin may reduce cancer incidence and/or mortality among type 2 diabetes patients, compared to those taking other antidiabetic medications [15,16]. A number of epidemiological studies have investigated the effects of metformin in ovarian cancer demonstrating the beneficial effects of metformin on the survival outcomes and prevention of ovarian cancer [17,18]. Preclinical results propose that metformin exerts antineoplastic effects through multiple direct (insulin-independent) and indirect (insulin-dependent) pathways. Recent evidences have shown that the treatment with metformin alone or combined with standard chemotherapeutic agents had substantial antineoplastic effects in various cancers through inhibiting cell growth, angiogenesis, metastasis, inducing apoptosis, targeting NF- $\kappa$ B pathway resulting in decreased secretion of proinflammatory cytokines and reversing multidrug resistance [19,20]. In the present study, we investigate the use of metformin as a new treatment option for cisplatin-resistant and paclitaxel-resistant ovarian cancer.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell lines**

The resistant cells were developed using a pulse-selection strategy followed by recovery in drug free media in order to mimic chemotherapy administration in the clinic. The EOC parental cell line A2780 and the cisplatin-resistant cell line ACRP was

generously provided by Dr. Pat J. Morin (National Institutes of Health, MD, USA). ACRP cells were selected for progressive resistance to cisplatin as previously described [21]. The A2780-PR cell line was established in our laboratory from its parental cell A2780 with a stepwise increase of paclitaxel concentration. Drug concentration of paclitaxel was increased by 2-fold increase at each step of resistance, from 2 nM up to 128 nM. The cell lines were short tandem repeats (STR) fingerprinted in order to confirm identity.

### **Cell Culture and Morphological Analysis**

The EOC cell lines A2780, ACRP and A2780-PR were maintained in RPMI-1640 (Gibco, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Gibco, NY, USA) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Cell morphology was observed using a Zeiss Observer Z1 microscope and all images were captured using Axio-Vision Rel. 4.8 software (Carl Zeiss, Jena, Germany)

### **Cytotoxic analysis**

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays were used to measure the cytotoxic effects of metformin (MET) (Sigma-Aldrich, MO, USA), cisplatin (CDDP) (LIBBS, SP, Brazil) and paclitaxel (PTX) (Acoord Farmacêutica LTDA, SP, Brazil) on A2780, ACRP and A2780-PR cells. Briefly, cells were seeded (1x10<sup>4</sup> cells/well) at 96-well plates. After incubation to allow cells adhesion, cells were exposed to various concentrations of CDDP (100 nM - 1 mM), PTX (1 nM – 10 µM) or MET (10 µM – 100 mM) with 100 µl/well for 24 and 48 h. Drug-free medium was added to the control and blank wells. After exposure was finished, 20 µL MTT (5 mg/mL) were added to each well. After 4 h, MTT solution was removed and the insoluble formazan crystals were dissolved in 150 µl of DMSO (Sigma-Aldrich, MO, USA). The optical density was determined using Flex-Station 3 (Molecular Devices Corporation, CA, USA). All experiments were performed in triplicates.

### **Reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)**

Total RNA was isolated from cells by using Trizol® reagent (Invitrogen, CA, USA) according to the standard protocol. RNA was reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. mRNAs were quantified by real-time PCR analysis (Vii7; Applied Biosystems, CA, USA) using Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, CA, USA). The expression values of genes from different samples were calculated by normalizing with GAPDH and relative quantitation values were plotted. The sequences of PCR primers were displayed in Supplementary Table 1.

### **Cell cycle and apoptosis analysis by flow cytometry**

After cells were seeded for 24 h, the cells reached ~75% confluence and were then treated with cisplatin, paclitaxel and metformin. Cells were harvested by trypsinization after the treatment, transferred into cytometry tubes and centrifuged at 450 x g for 10 min at 4°C. After washing with PBS, Nicoletti buffer (0.1% sodium citrate (w/v), 0.1% NP-40 (w/v), 200 µg/ml RNase and propidium iodide 50 µg/ml) was added to the cell pellets which were re-suspended by gentle pipetting and left for 30 minutes in the dark (4°C) [22]. Doublets and debris were identified and excluded. The quality of cell cycle data was assessed using coefficient of variation (CV) of the G1 peak. A CV of <6% was considered acceptable. Approximately 20000 cells were used for each analysis, samples were run in low flow rate and the distribution of cells in each phase of the cell cycle was displayed as histograms. Stained cells were detected with BD Accuri™ C6 Flow Cytometer and quantified with CFlow® software (BD, CA, USA).

### **Statistical analyses**

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, CA, USA). All values were presented as mean ± SD

and the differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Differences between experimental groups were evaluated by one-way ANOVA. A  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## RESULTS

### **Establishment of cisplatin-resistant cell line and paclitaxel-resistant cell line.**

*In vitro* chemoresistant cell line models are essential tools for investigating the mechanisms involved in drug response and for the development of novel treatment strategies. The IC<sub>50</sub> values of EOC cells are presented in Figure 1C. The ACRP cells demonstrated an increase in the cisplatin IC<sub>50</sub> compared with that of the parental cell line A2780 (approximately 8-fold increase). A significant increase in paclitaxel IC<sub>50</sub> concentrations was observed in A2780-PR cells (4.9  $\mu$ M vs. 0.9  $\mu$ M) demonstrating a 5-fold increase compared to A2780 cells. Taken together, these initial data demonstrated the development of a drug-resistant phenotype in these cell lines (Figure 1).

The resistant cells also exhibited distinct morphological alterations compared to the parental cell line. ACRP cells seemed to undergo phenomenal cellular enlargement compared with parental cell line. Similarly, A2780-PR exhibited significant shape variability with many cells having a more elongated shaped. Both resistant cells lines displayed fibroblastoid, elongated, fusiform features with extend pseudopodia not seen in the parental cells (Figure 1D).

### **Expression of inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ B signaling pathway in ACRP and A2780-PR cells.**

To explore the possible molecular mechanisms underlying cisplatin and paclitaxel resistance, RT-qPCR analysis were performed to investigate the NF- $\kappa$ B and inflammatory cytokines expression. Our results revealed enhanced NF- $\kappa$ B/p65, IKK $\alpha$ ,

IKK $\beta$  and IKK $\gamma$  expression levels in cisplatin-resistant cells compared with the parental cell line. Additionally, statistically significant increases of NF- $\kappa$ B/p65, IKK $\beta$  and IKK $\gamma$  mRNA expression were observed in paclitaxel resistant cells. As expected, the induction of resistance increased the expression of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in ACRP and A2780-PR compared with the parental cell line A2780 (Figure 2).

### **Effects of metformin on proliferation of EOC cells.**

We next evaluate the efficacy of metformin in human EOC cell lines treated with increasing concentrations of metformin for 24 h and 48 h. As shown in Figure 3, metformin induced significant cell viability inhibition on EOC cells in a dose-dependent manner with an IC<sub>50</sub> ranging from 0.24 mM in the most sensitive cell line (ACRP) to 1.61 mM in parental cell line (A2780) at 24 h.

### **Cytotoxicity analysis of standard chemotherapy with metformin in human EOC cell lines.**

Although several studies have determined the beneficial use of metformin in combination with chemotherapy, the majority of reports used a supraphysiologic dose of metformin [23,24]. However, pharmacokinetics studies of metformin have revealed that plasma drug concentrations reported in diabetic patients achieved in the micromolar range (2.8-15  $\mu$ M) [25]. To further explore the anticancer effect of metformin, we conducted a combination treatment with physiologic (10  $\mu$ M) and supraphysiologic doses (1 mM and 10 mM) of metformin with paclitaxel and cisplatin in resistant cells lines.

The cotreatment with physiologic dose of metformin and cisplatin in different concentrations induced slight inhibition of proliferation in ACRP compared to cisplatin treatment alone in 24 h. However, in A2780 cells, this inhibition was less pronounced



compared with ACRP. Similar pattern of inhibition was observed at the 48 h time points (Figure 4). It is important to emphasize that combination of metformin at 10  $\mu$ M with cisplatin reduced cell proliferation in cisplatin-resistant cells to similar levels of parental cell line. Despite pronounced decrease in cell viability observed in the combination of supraphysiologic doses of metformin with cisplatin, in both cancer cell lines, our results indicated that metformin in high doses was capable of reduced cell proliferation in monotherapy, therefore this combination did not improve the inhibition of proliferation in EOC cells (Figure 3A and Figure 4). An interesting observation that needs to be pointed out is that when metformin was combined with paclitaxel, in A2780-PR cells, the combination induced substantial decrease in proliferation compared with treatment with taxane alone in 24 h and 48 h (Figure 5). The results demonstrated that cotreatment with physiologic dose of metformin and paclitaxel in A2780-PR cells overcome paclitaxel resistance inhibiting cell proliferation equivalent to paclitaxel alone in parental cell line.

#### **Cell cycle analysis of cisplatin with metformin in human EOC cell lines A2780, ACRP and A2780-PR.**

In order to determine the effects of physiologic (10  $\mu$ M) and supraphysiologic doses (10 mM) of metformin on cell cycle progression, EOC cells were treated with the drug for 48 h and then flow cytometry was performed. Metformin treatment increased cells in G0/G1 phase and decreased the number of cells in S phase. In parental cell line, the effects of metformin on the cell cycle were less evident. In ACRP cells treatment with 10 mM disturbed cell cycle with more than 18% of cells in sub-G0/G1 phase, implying that apoptosis is possibly the predominating event in those cells following metformin treatment (Figure 6). It is important to emphasize that sub-G0/G1 is represented by cells with discontinuous fragmentation of DNA often defined as hypodiploid peak subpopulation.

We next assessed the effect of the combination treatment on cell cycle distribution. The experiment was performed at the 48 h time point in EOC cells. The cotreatment with physiologic dose of metformin and paclitaxel decreased cells in G2/M phases compared to paclitaxel alone in A2780 and A2780-PR cells (Figure 6C). Interestingly, the combination treatment of metformin and paclitaxel (5  $\mu$ M) led to the accumulation of small DNA fragments in the sub-G0/G1 phase in A2780-PR cells compared to paclitaxel alone. Similar results were found in parental cell line with increase in sub-G0/G1. The region corresponding to cells with sub-G0/G1 DNA content (considered as apoptotic cells) is indicated in Figure 6A.

A sub-G0/G1 peak was also observed in ACRP cells suggesting some cells undergoing apoptosis after treatment with cisplatin in monotherapy and in cotreatment with metformin. In contrast, combination with metformin did not induce a significant increase in sub-G0/G1 phase in A2780 cells compared with cisplatin alone (Figure 6B).

#### **Gene expression of inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ B signaling pathway in EOC cells cotreated with conventional chemotherapy and metformin.**

In light of the important mechanism of cytokines in ovarian tumor drug resistance, we next evaluate the possible modulation of IL-6, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in EOC cells treated with conventional chemotherapy and clinical relevance dose of metformin. There was no significant difference in IL-6 mRNA expression in response to metformin in either A2780 or ACRP cells. Nevertheless, cisplatin treatment in EOC cells increased expression of IL-6 mRNA. Interestingly, combination therapy of cisplatin 20  $\mu$ M with metformin was found to significantly decrease mRNA levels of IL-6 in ACRP cells. We observed that metformin decreased IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA expression in ACRP cells; however, metformin showed no significant effect on modulating the cytokines levels in A2780. The IL-1 $\alpha$  mRNA expression level was significantly decreased in ACRP cells

following cotreatment with cisplatin 5  $\mu$ M and metformin. Similar results were observed in IL-1 $\beta$  mRNA expression (Supplementary Figure 1).

In A2780-PR cells metformin decreased IL-6 mRNA levels. Furthermore, the combinational treatment of metformin and paclitaxel significantly decreased IL-6 mRNA expression to levels comparable with parental cells. We also observed that combination of paclitaxel and metformin decreased IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA expression in paclitaxel-resistant cells (Supplementary Figure 2).

An active NF- $\kappa$ B pathway is often associated with tumor survival and chemoresistance in many tumors, including ovarian cancer. We observed that metformin showed no effect on NF- $\kappa$ B/p65 expression in A2780 and ACRP cells. In contrast, in paclitaxel-resistant cells metformin treatment suppresses NF- $\kappa$ B/p65 mRNA levels. The IKK $\alpha$  mRNA expression level was significantly decreased in A2780 and ACRP cells in response to cotreatment with cisplatin and metformin. In A2780-PR cells the combinational treatment of metformin and paclitaxel significantly decreased IKK $\alpha$  and IKK $\gamma$  mRNA expression. Surprisingly, no similar results were observed in IKK $\beta$  mRNA levels (Supplementary Figure 3 and Supplementary Figure 4)

## **DISCUSSION**

Chemoresistance remains the major therapeutic barrier in EOC. Combination treatment is a particularly attractive strategy to enhance sensitivity to platinum and taxanes. In the present study, we investigate the use of metformin to reverse the cisplatin and paclitaxel-resistance in EOC cells. Our study used wild type (A2780) and cisplatin-resistant human EOC cells (ACRP) [21]. Furthermore we established a paclitaxel-resistant cell line A2780-PR. The resistance cell lines were developed using a pulse-selection strategy followed by recovery in drug free media in order to mimic chemotherapy administration in the clinic. This model often presents a low fold

resistance compared with other studies that applied a continuous treatment method. We demonstrated that ACRP cells increased in approximately 8-fold the IC<sub>50</sub> compared with parental cells and A2780-PR demonstrated a 5-fold increase compared to the original parental cell line (Figure 1). These results are in consonance with McDermott and colleagues which compared cell lines that have been established from cancer patients before and after chemotherapy and found a two- to five-fold increase from IC<sub>50</sub> value of resistant cells [26]

There is significant interest in using metformin as an anticancer agent because its safety profile, epidemiological data and encouraging evidence from human clinical trials, especially in cancers with limited treatment options, such as ovarian cancer. Our *in vitro* cytotoxicity assay demonstrated marked inhibitory impact of metformin on ovarian cancer cell lines, with resistant cells (ACRP and A2780-PR), being the most responsive. Metformin induced significant cell viability inhibition on A2780, ACRP and A2780-PR cells lines in a dose-dependent manner at 24 h and 48 h (Figure 3).

Remarkably, it has been demonstrated that metformin act in synergy with certain anti-cancer agents as well as to overcome chemoresistance of various types of tumors, providing a hopeful rationale for use in combination with conventional chemotherapy. In the current study, we demonstrated that cotreatment with physiologic dose of metformin and paclitaxel in A2780-PR cells overcome paclitaxel resistance inhibiting cell proliferation equivalent to paclitaxel alone in parental cell line (Figure 5). It has also been shown that metformin enhances the chemo-sensitivity of ACRP cells to cisplatin, inhibiting cell proliferation to similar levels of parental cell line A2780 (Figure 4). Recent evidences have shown that treatment with micromolar concentrations of metformin in conjunction with carboplatin caused a synergistic enhancement in cytotoxicity of ovarian cancer cell lines [13]. Zhang et al., also found that metformin at low dose did not affect the proliferation of ovarian cancer cells, enhanced the anticancer effect of

cisplatin and lowered the proportion of cancer stem cells (CSCs) in xenografts models [27]. Furthermore, clinical relevant doses of metformin was capable of inhibit the growth of ovarian tumors and improves response to paclitaxel in mice models [14].

Our data showed that metformin at micromolar dose slightly increased cells in G0/G1 phase. Moreover, the combinational treatment of micromolar dose of metformin with cisplatin increased sub-G0/G1 phase, but there was no obvious change in G0/G1 phase in ACRP cells. In parental cells, we did not observe any increased in sub-G0/G1 phase in cotreatment with metformin and cisplatin (Figure 6). In contrast, previous study have shown that exposure of both carboplatin and micromolar dose of metformin brought about an increase in cells in the sub-G0/G1 phase in A2780 ovarian cancer cell line [13]. Similarly, the combination treatment of micromolar dose of metformin and paclitaxel led to increase in sub-G0/G1 phase in parental and paclitaxel-resistant cells line showing that the combination of metformin with paclitaxel was more effective than taxane alone (Figure 6).

Several lines of evidence indicate that NF- $\kappa$ B signaling pathways are involved in development of cancer chemoresistance [4, 5]. Recently, immunohistochemical studies showed that NF- $\kappa$ B1 and c-Rel were overexpressed in chemoresistant EOC tissues compared with the chemosensitive group [26]. Our RT-qPCR analysis revealed enhanced NF- $\kappa$ B/p65, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  and IKK $\gamma$  expression levels in cisplatin-resistant cells compared with the parental cell line. Additionally, statistically significant increases NF- $\kappa$ B/p65, IKK $\beta$  and IKK $\gamma$  mRNA expression were observed in paclitaxel-resistant cells (Figure 2). We also observed that metformin decrease mRNA levels of NF- $\kappa$ B/p65 in paclitaxel-resistant cell line, but no effect was found in A2780 and ACRP cells. The IKK $\alpha$  mRNA expression level was significantly decreased in A2780, ACRP and A2780-PR cells after combinatorial treatment with metformin and conventional chemotherapy (Supplementary Figure 3 and Supplementary Figure 4). In agreement with our work,

Shuang et al. observed that NF- $\kappa$ B1 and c-Rel expression was significantly upregulated both at mRNA and protein levels in paclitaxel-resistant SKOV3-TR30 cells than the parental cell line [29]. Metformin also was shown to preferentially inhibit nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in CSC cells compared with non-CSC [30].

The mRNA profile found in our study for IL-6, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  genes in resistant cells was consistent with studies that implicated deregulated cytokine expression as a crucial aspect of many drug resistance mechanisms [10, 31]. Patients with ovarian cancer have higher levels of IL-6 in the serum and peritoneal fluid and increased IL-6 levels are associated with poor prognosis in ovarian cancer [32]. Indeed, cisplatin upregulated IL-6 mRNA in ovarian carcinoma cell lines and cells drawn from patients with platinum-resistant ovarian carcinoma [33]. Our results revealed significantly decrease in the expression of IL-6 mRNA levels in combinatorial treatment with metformin and conventional agents in resistant cells to levels comparable with parental counterpart A2780 (Supplementary Figure 1 and Supplementary Figure 2).

IL-1 is an essential proinflammatory cytokine that belongs to the IL-1 family. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are the two major IL-1 receptor (IL-1R) agonists, share biologic activities but differ in the manner in which they are processed and secreted [34]. We observed that combination of conventional drugs with metformin decreased IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA expression in resistant cells (Supplementary Figure 1 and Supplementary Figure 2). Recent study have shown that metformin decreased the production of inflammatory molecules in an inducible model of breast cell transformation [30]. Taken together, our observations suggest that metformin inhibits the inflammatory pathway induced by paclitaxel and cisplatin treatment.

## **CONCLUSION**

In conclusion, resistance to conventional chemotherapy is a major problem in the treatment of EOC contributing to the poor survival rate. Our data demonstrate that metformin inhibits proliferation in paclitaxel-resistant and in cisplatin-resistant cell lines. Additionally, metformin treatment improved the sensitivity of resistant cell lines to conventional drugs. Metformin, in clinical relevant doses, was able to significantly reduce the mRNA expression of inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ B signaling pathway in EOC cells. Although, further studies are required to confirm the results obtained by RT-qPCR on protein level, the results of the present study provide a rationale for using metformin-based combinatorial chemotherapy in chemotherapy-resistant ovarian cancers.

## REFERENCE

- [1] Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol* 2008;27(2):161–74.
- [2] Yeung T, Leung CS, Yip KP, Yeung CLA, Wong STC, Mok SC. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 309(7): 444-56.
- [3] Chang SJ, Hodeib M, Chang J, Bristow RE. Survival impact of complete cytoreduction to no gross residual disease for advanced-stage ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2013;130(3):493-98.
- [4] Uno M, Saitoh Y, Mochida K, Tsuruyama E, Kiyono T, Imoto I et al. NF- $\kappa$ B inducing kinase, a central signaling component of the non-canonical pathway of NF- $\kappa$ B, contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* 2014;9(2):e88347.
- [5] Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, Hayasaka T, Kimura A, Ohta T et al. Inhibition of NF $\kappa$ B increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *J Biol Chem* 2004;279(22):23477-85.
- [6] Yang YI, Ahn JH, Lee KT, Shih IeM, Choi JH. RSF1 Is a Positive Regulator of NF- $\kappa$ B–Induced Gene Expression Required for Ovarian Cancer Chemoresistance. *Cancer Res* 2014;74(8):2258–69.
- [7] Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-55.
- [8] Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004;6(3):203-8.
- [9] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S et al. NF- $\kappa$ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431: 461-6.
- [10] Holohan C, Van SS, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;13(10):714-26.



- [11] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2013;12:86.
- [12] Rattan R, Graham R, Maguire J, Giri S, Shridhar V. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia* 2011;13(5):483–91.
- [13] Erices R, Bravo M, Gonzalez P, Oliva B, Racordon D, Garrido M et al. Metformin, at concentrations corresponding to the treatment of diabetes, potentiates the cytotoxic effects of carboplatin in cultures of ovarian cancer cells. *Reprod Sci* 2013;20(12):1433–46.
- [14] Lengyel E, Litchfield LM, Mitra AK, Nieman KM, Mukherjee A, Zhang Y et al. Metformin inhibits ovarian cancer growth and increases sensitivity to paclitaxel in mouse models. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212(4):1-18.
- [15] Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005;330(7503):1304-5.
- [16] Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(20):3297-302.
- [17] Romero IL, McCormick A, McEwen KA et al. Relationship of type II diabetes and metformin use to ovarian cancer progression, survival, and chemosensitivity. *Obstet Gynecol* 2012;119(1):61-7.
- [18] Kumar S, Meuter A, Thapa P, Langstraat C, Giri S, Chien J et al. Metformin intake is associated with better survival in ovarian cancer: A case-control study. *Cancer*. 2013;119(3):555-62.
- [19] Kim HG, Hien TT, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Kang KW et al. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- $\kappa$ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *Br J Pharmacol* 2011;162(5):1096-108.

- [20] Wu B, Li S, Sheng L, Zhu J, Gu L, Shen H et al. Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. *Oncol Rep* 2012;28(3):903-8.
- [21] Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 2003;3(4):377-86.
- [22] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;139(2):271-9.
- [23] Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, Struhl K. selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res* 2009;69(19):7507-11.
- [24] Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, Osório-Costa F, Rossato FA, Vercesi AE et al. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clin Cancer Res* 2011;17(12):3993-4005.
- [25] Dowling RJ, Lam S, Bassi C, Mouaaz S, Aman A, Kiyota T et al. Metformin pharmacokinetics in mouse tumors: Implications for human therapy. *Cell Metab* 2016;23(4):567-68.
- [26] McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M et al. *In vitro* Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Front Oncol* 2014;4(40):1-16.
- [27] Zhang R, Zhang P, Wang H, Hou D, Li W, Xiao G et al. Inhibitory effects of metformin at low concentration on epithelial-mesenchymal transition of CD44(+) CD117(+) ovarian cancer stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2015;6(262):1-12.
- [28] Shuang T, Wang M, Zhou Y, Shi C. Over-expression of nuclear NF- $\kappa$ B1 and c-Rel correlates with chemoresistance and prognosis of serous epithelial ovarian cancer. *Exp Mol Pathol* 2016;100(1):139-44.

- [29] Shuang T, Wang M, Zhou Y, Shi C, Wang D. NF- $\kappa$ B1, c-Rel, and ELK1 inhibit miR-134 expression leading to TAB1 upregulation in paclitaxel-resistant human ovarian cancer *Oncotarget* 2017;8(15):24853–68.
- [30] Hirsch HA, Iliopoulos D, Struhl K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(3):972-7.
- [31] Ho EA, Piquette-Miller M. Regulation of multidrug resistance by pro-inflammatory cytokines. *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6(4):295–311.
- [32] Lane D, Matte I, Garde-Granger P, Laplante C, Carignan A, Rancourt C et al. Inflammation-regulating factors in ascites as predictive biomarkers of drug resistance and progression-free survival in serous epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer* 2015;15(492):1-11.
- [33] Cohen S, Bruchim I, Graiver D, Evron Z, Oron-Karni V, Pasmanik-Chor M et al. Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by IL-6 secretion via the increased expression of its target cIAP-2. *J Mol Med* 2013;91(3):357-68.
- [34] Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 1994;5(6):517-31.

**Figure 1:** (A) Effects of paclitaxel in A2780 and A2780-PR cell lines. (B) Effects of cisplatin in A2780 and ACRP cells. Cells were treated with paclitaxel (1 nM - 10  $\mu$ M) or cisplatin (100 nM – 1 mM) for 24/48 h. (C) IC<sub>50</sub> values calculated by the MTT assay in 24 h. Results are expressed as percentage of control (untreated cells) as mean $\pm$ SD (n=3). *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*. \* *p*<0.05. (D) Morphological changes in the cisplatin-resistant A2780 cell line (ACRP) and paclitaxel-resistant A280 cell line (A2780-PR). Cells were examined using phase-contrast microscopy.

**Figure 2:** Gene expression analysis of cisplatin-resistant ACRP and paclitaxel-resistant A2780-PR cells compared with parental cell line, A2780. The expression values of genes from different samples were calculated by normalizing with GAPDH. All experiments were performed in triplicates and *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*. \* *p*<0.05. (A/B) Resistant cells show higher expression of cytokines and members of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in comparison to the parental cells.

**Figure 3:** (A) Effects of metformin in A2780, ACRP and A2780-PR cell lines. EOC cell lines were treated with metformin (10  $\mu$ M – 100 mM) for 24/48h. (B) IC<sub>50</sub> values calculated by the MTT assay in 24 h. *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*. \* *p*<0.05.

**Figure 4:** Effects of cisplatin with metformin in EOC cells. A2780 and ACRP cells were treated with cisplatin or paclitaxel alone or in combination with metformin for 24 and 48 h. Cellular proliferation was assessed by the MTT assay. Results are expressed as percentage of control (untreated cells) as mean $\pm$ SD (n=3). *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*. \* *p*<0.05.

**Figure 5:** Effects of paclitaxel with metformin in EOC cells. A2780 and A2780-PR cells were treated with cisplatin or paclitaxel alone or in combination with metformin for 24 and 48 h. Cellular proliferation was assessed by the MTT assay. Results are expressed as percentage of control (untreated cells) as mean $\pm$ SD (n=3). *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*.\*  $p < 0.05$ .

**Figure 6:** Analysis of cell cycle of conventional chemotherapy with metformin in EOC cells. (A) Histograms of distribution of cells in sub-G0/G1, G1, S or G2/M phases of cell cycle from one experiment of A2780-PR is shown. (B/C) The graph showed the result of three independent experiments expressed as mean $\pm$ SD (n=3). *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*.\*  $p < 0.05$ .

## ADDITIONAL FILE

**Supplementary Figure 1:** Gene expression analysis of A2780 and ACRP cells after treatment with cisplatin with micromolar dose of metformin for 48 h. The expression values of cytokines genes from different samples were calculated by normalizing with GAPDH. Data shown are the mean $\pm$ SD of triplicate analysis and *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*. \* *p* <0.05.

**Supplementary Figure 2:** Gene expression analysis of A2780 and A2780-PR cells after treatment with paclitaxel with micromolar dose of metformin for 48 h. The expression values of cytokines genes from different samples were calculated by normalizing with GAPDH. Data shown are the mean $\pm$ SD of triplicate analysis and *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*. \* *p* <0.05.

**Supplementary Figure 3:** Gene expression analysis of A2780 and ACRP cells after treatment with cisplatin with micromolar dose of metformin for 48 h. The expression values of NF- $\kappa$ B signaling pathway were calculated by normalizing with GAPDH. Data shown are the mean $\pm$ SD of triplicate analysis and *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*. \* *p* <0.05.

**Supplementary Figure 4:** Gene expression analysis of A2780 and A2780-PR cells after treatment with paclitaxel with micromolar dose of metformin for 48 h. The expression values of NF- $\kappa$ B signaling pathway were calculated by normalizing with GAPDH. Data shown are the mean $\pm$ SD of triplicate analysis and *p-values* are based on one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc test*. \* *p* <0.05.

## SUPPLEMENTARY TABLE 1

Table 1. The sequences of PCR primers

NF- $\kappa$ B p65	Forward: CCTGGAGCAGGCTATCAGTC Reverse: ATGGGATGAGAAAGGACAGG
IKK $\alpha$	Forward: CAGCCATTTACCTGGCATGAG Reverse: CAGCCATTTACCTGGCATGAG
IKK $\beta$	Forward: ATCCCCGATAAGCCTGCCA Reverse: CTTGGGCTCTTGAAGGATACAG
IKK $\gamma$ (NEMO)	Forward: ACAGCTATGACACCGGAAGC Reverse: GCACCATCTCACACAGTTGG
IL-1 $\alpha$	Forward: CATCCTCCACAATAGCAGACAG Reverse: GAGTTTCCTGGCTATGGGATAAG
IL-1 $\beta$	Forward: CAAAGGCGGCCAGGATATAA Reverse: CTAGGGATTGAGTCCACATTCAG
IL-6	Forward: CATTTGTGGTTGGGTCAGG Reverse: AGTGAGGAACAAGCCAGAGC
GP130	Forward: TGCCTCCAGAAAAACCTAAAAA Reverse: TTTGTCTCCAAGTGTGTTTCC
GAPDH	Forward: CAGCCTCAAGATCATCAGCA Reverse: ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT





Figure 1

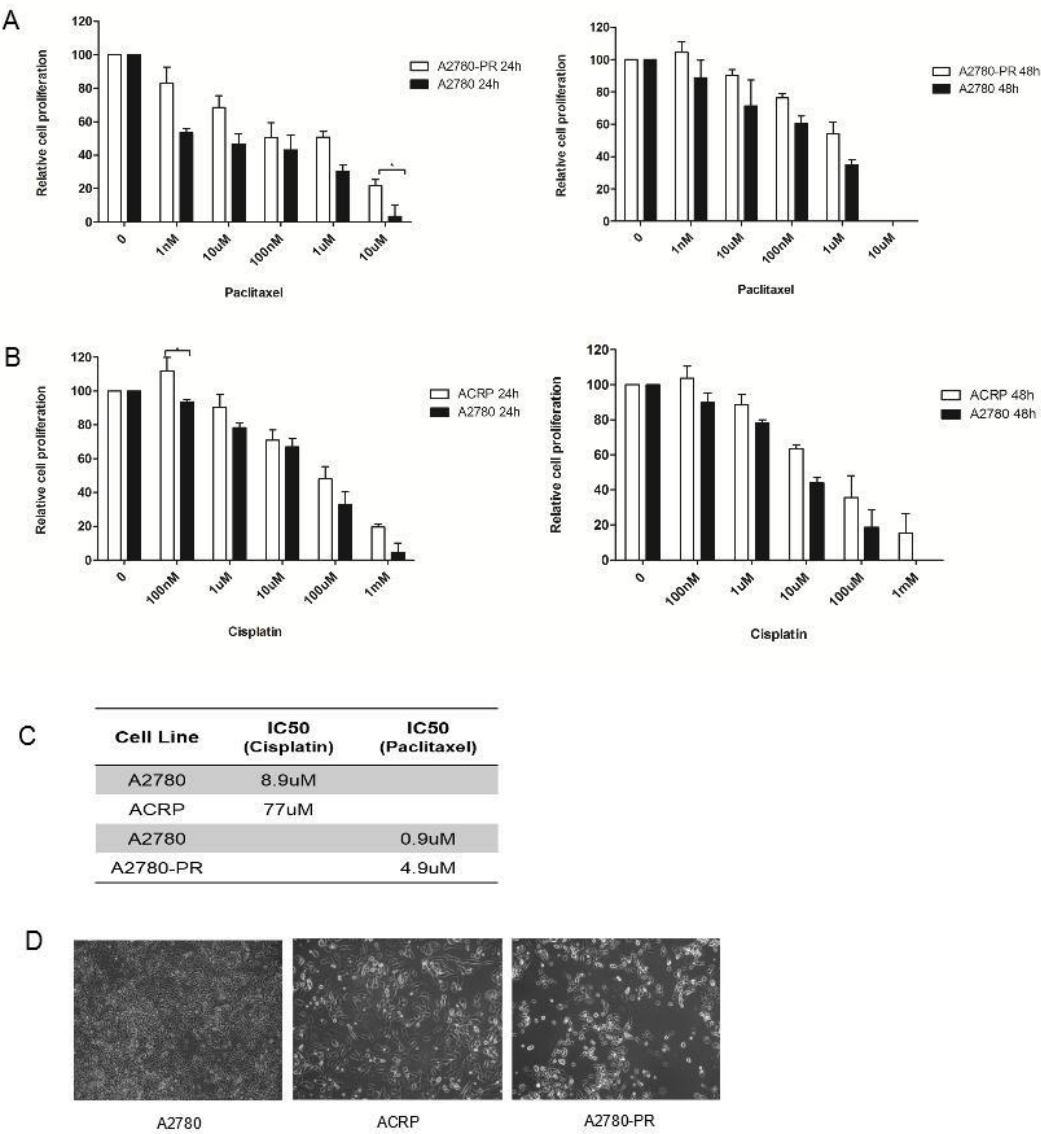


Figure 2

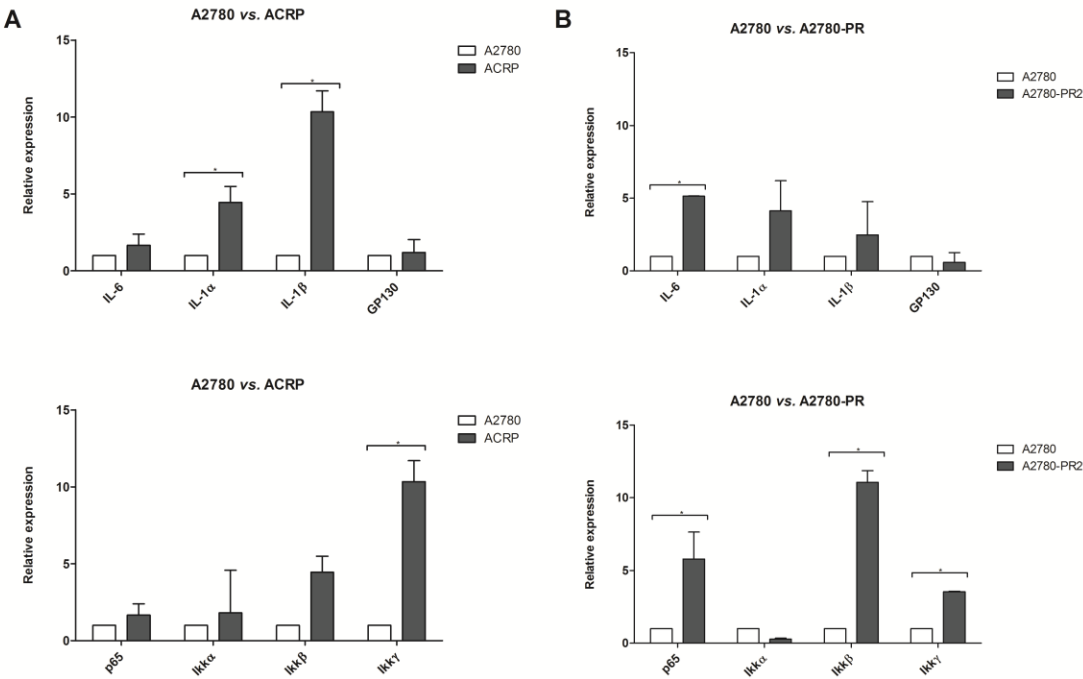
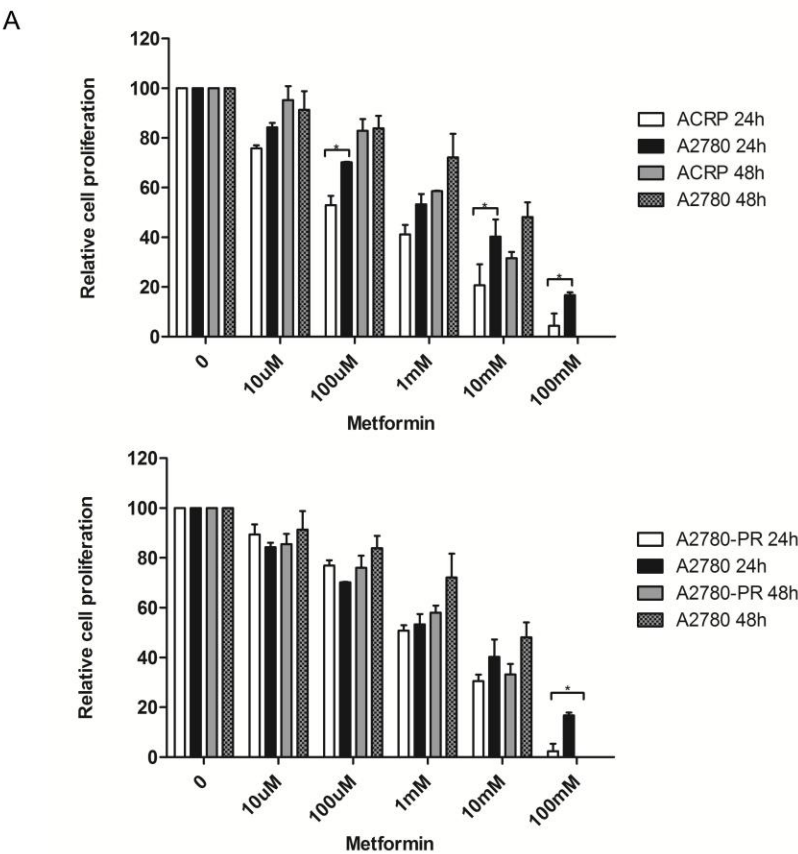


Figure 3



B

Cell Line	IC50 (Metformin)
A2780	1.61mM
ACRP	0.24mM
A2780-PR	1.15mM

Figure 4

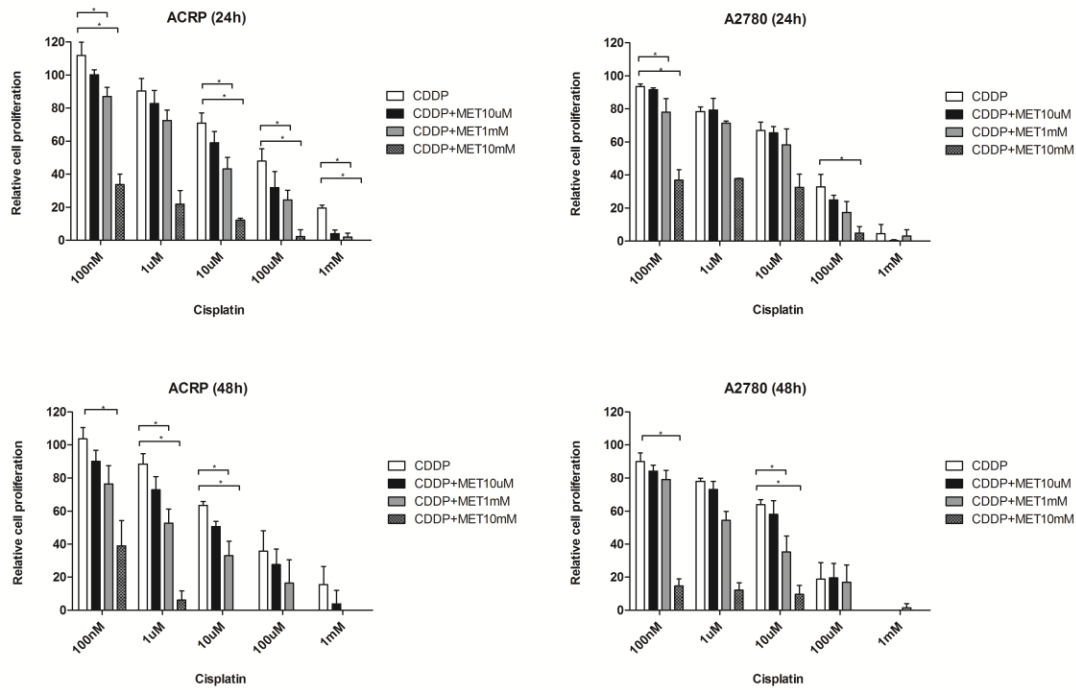


Figure 5

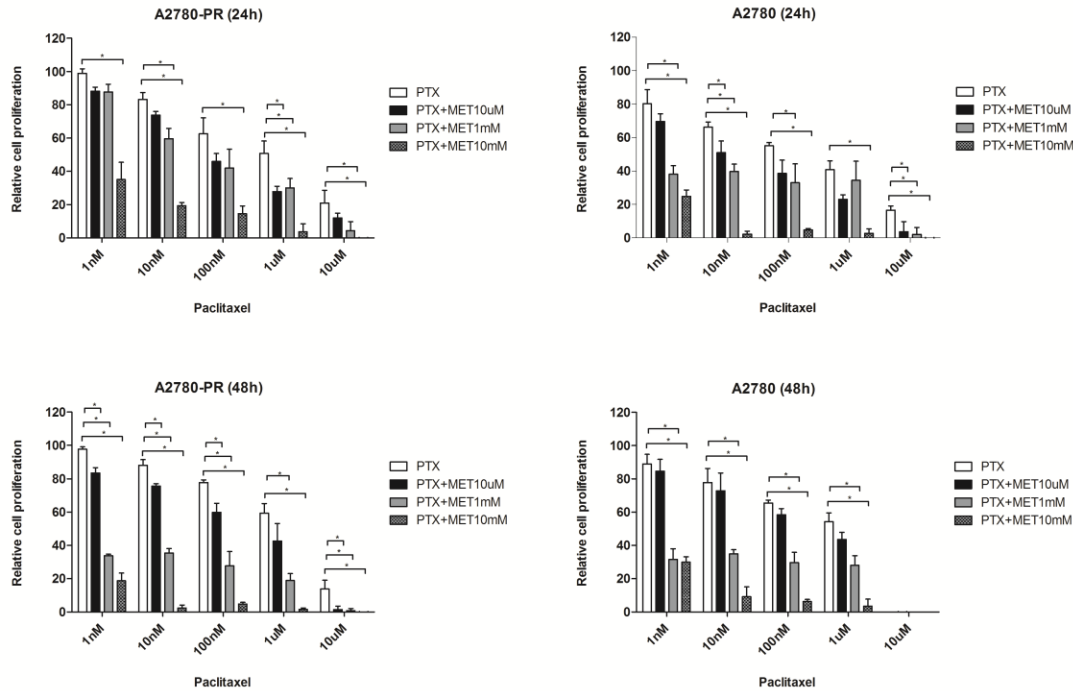
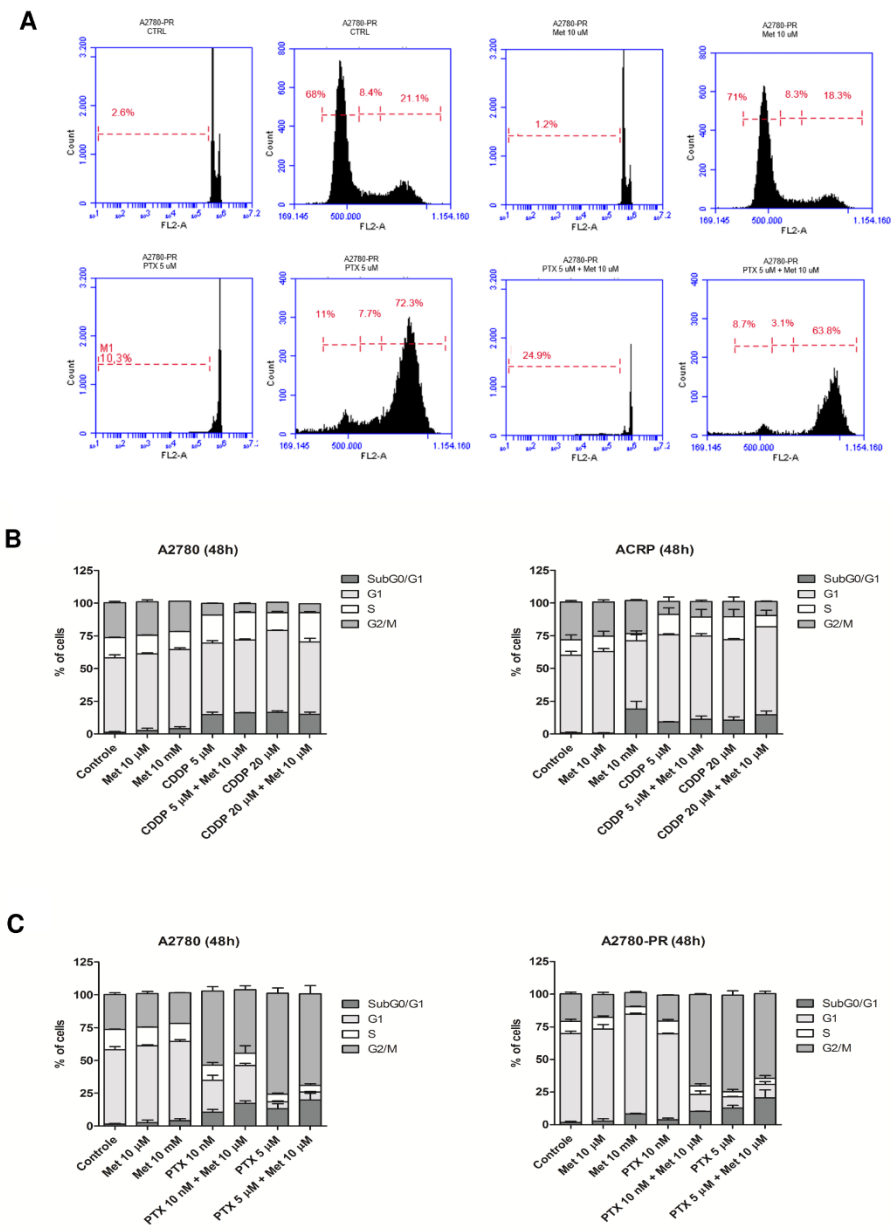
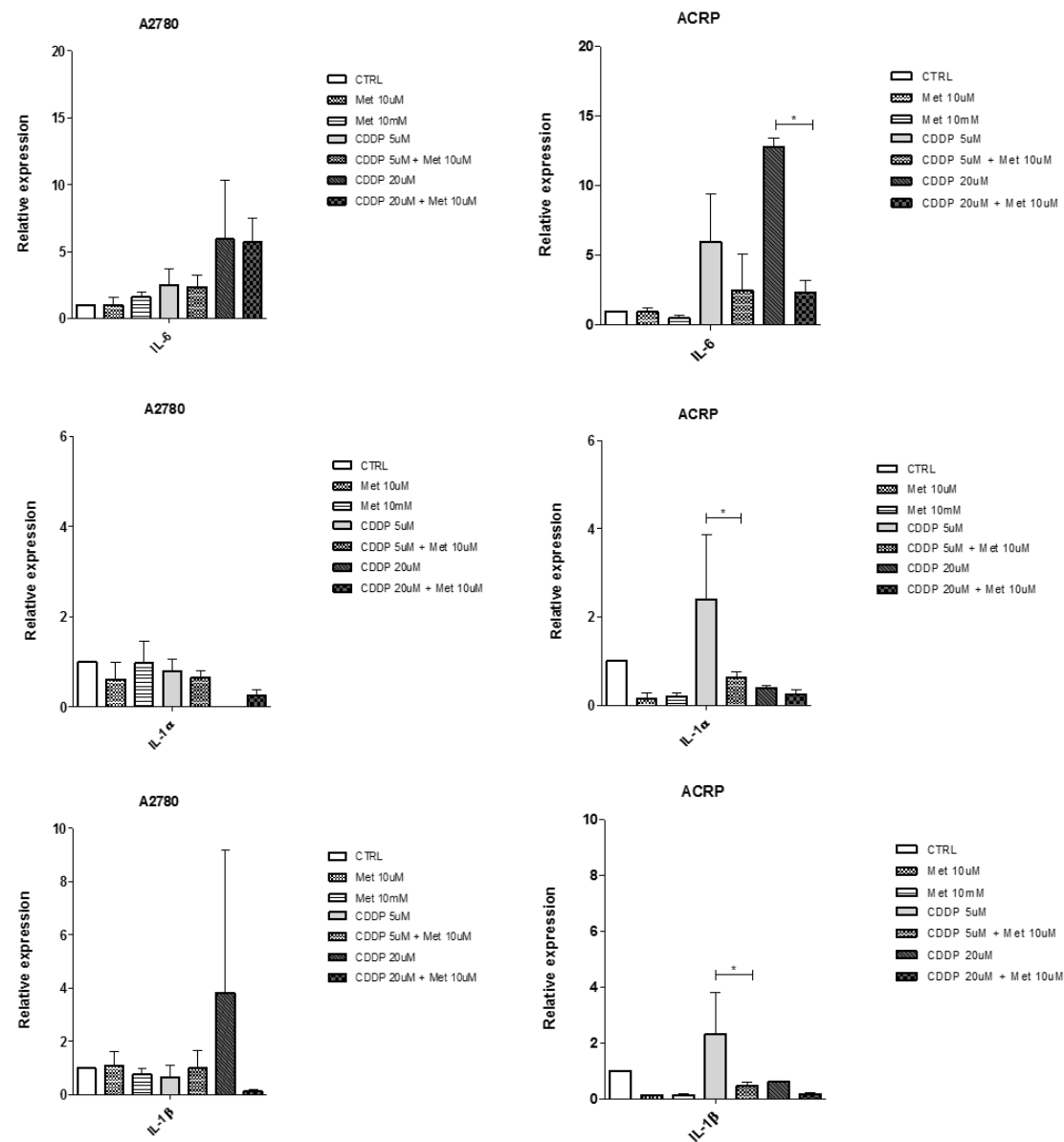


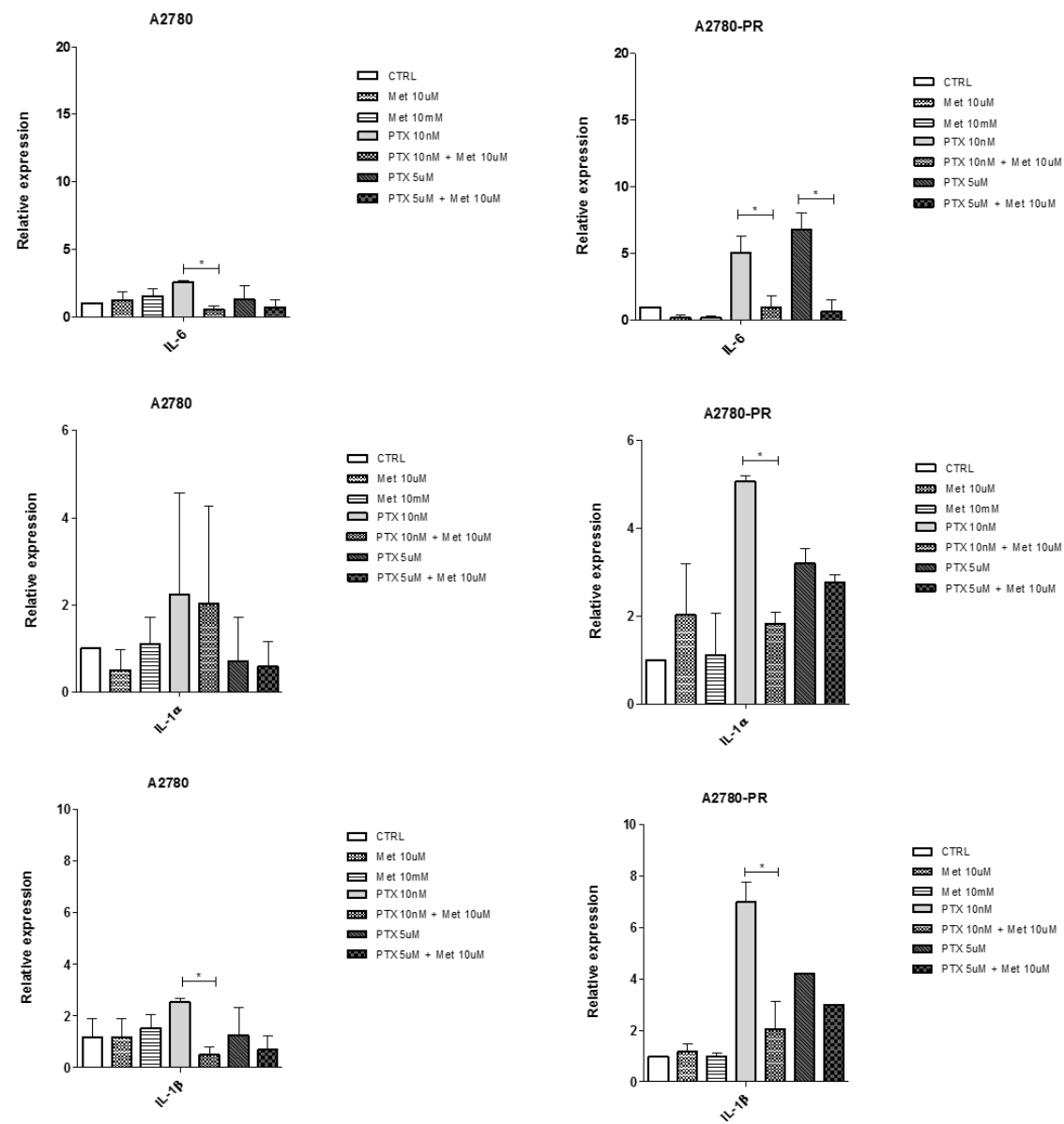
Figure 6



Supplementary Figure 1

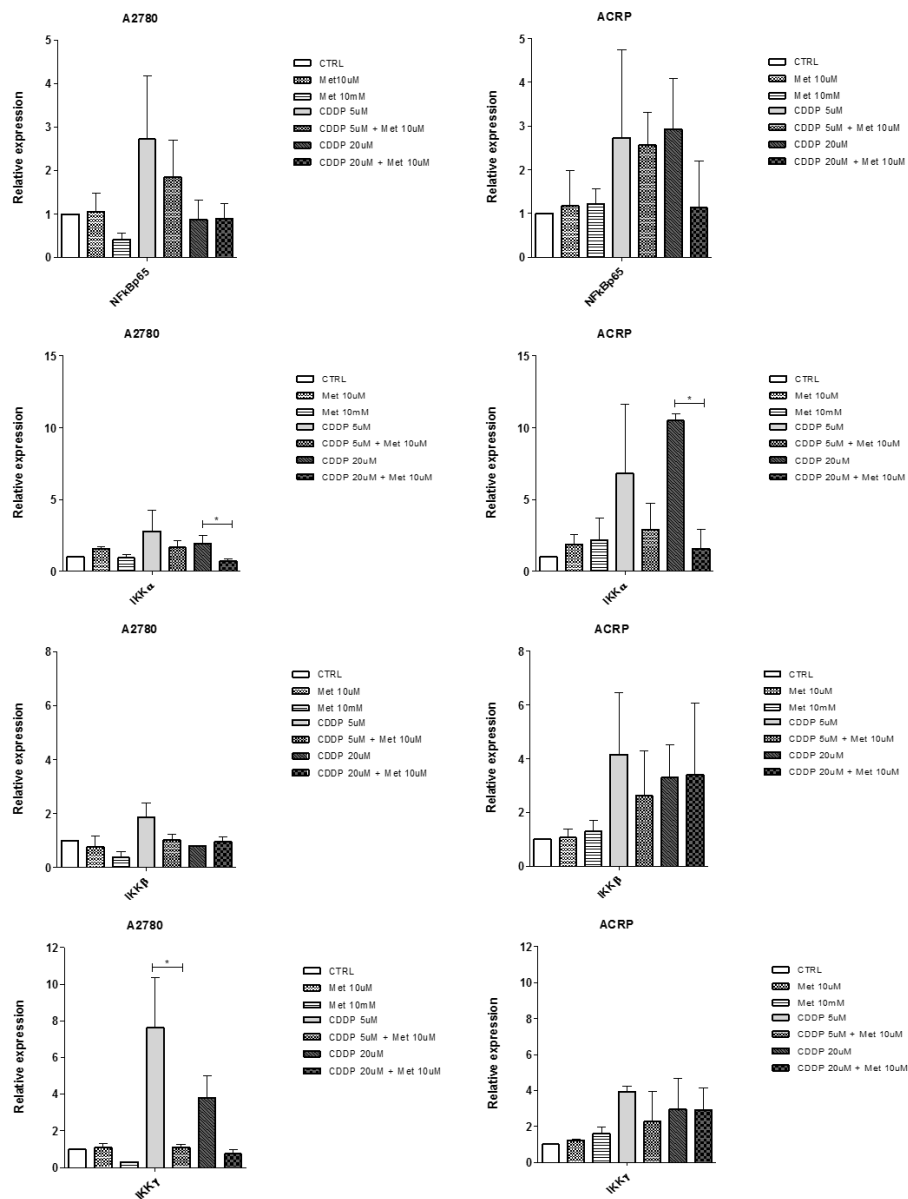


Supplementary Figure 2

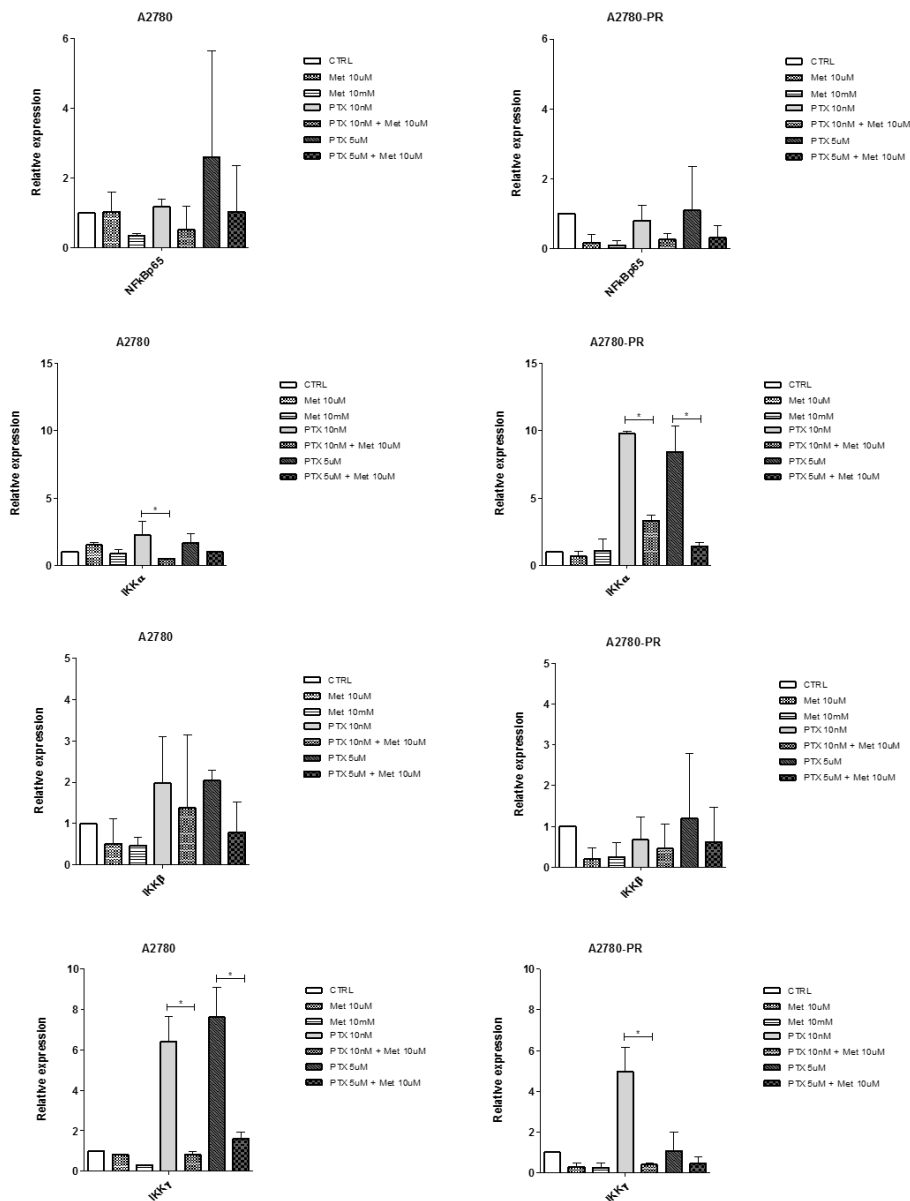




Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



ANEXO II

Home

Reports

Due to maintenance, EVISE will be unavailable on Wednesday January 3 between 8:00 am and 12:00 pm GMT.

My Author Tasks

Start New Submission

Click here to view your submissions with a final decision

My Submissions with Journal (1)

METFORMIN INHIBITS PROLIFERATION AND ENHANCE PACLITAXEL AND DOXORUBICIN ACTIVITY AGAINST TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER CELL LINES

Current status: With Editor (20/Dec2017)

NEO\_2017\_540  
Editor-in-Chief: Ainawaz Rehmentulla  
Article Type: Short communication  
Initial submission : 20/Dec2017